



Université de Sherbrooke

**Contribution de la protéase mastocytaire de type 4 (mMCP-4) dans un modèle  
d'encéphalopathie auto-immune expérimentale (EAE) chez la souris**

Par  
Louisane Desbiens  
Programme de pharmacologie

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé  
en vue de l'obtention du grade de *philosophiae doctor* (Ph. D.)  
en pharmacologie

Sherbrooke, Québec, Canada  
Avril, 2019

Membres du jury d'évaluation  
Pr Réjean Couture, Département de Pharmacologie et Physiologie, Faculté de Médecine,  
Université de Montréal  
Pr Alain Frigon, Département de Pharmacologie et Physiologie, Faculté de médecine et des  
sciences de la santé  
Pr Klaus Klarskov, Département de Pharmacologie et Physiologie, Faculté de médecine et  
des sciences de la santé  
Pr Pedro D'Orléans-Juste, Département de Pharmacologie et Physiologie, Faculté de  
médecine et des sciences de la santé

## **1. RÉSUMÉ**

### **Contribution de la protéase mastocytaire de type 4 (mMCP-4) dans un modèle d'encéphalopathie auto-immune expérimentale (EAE) chez la souris**

Par

Louisane Desbiens

Programmes de pharmacologie

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de *philosophiae doctor* (Ph.D.) en pharmacologie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

La sclérose en plaques (SEP) est une maladie neurodégénérative affectant particulièrement les femmes entre 20 et 45 ans. Des études ont montré que la SEP comporte une composante vasculaire associée à une infiltration lymphocytaire et mastocytaire au niveau du système nerveux central (SNC). De plus il a été montré que les patients atteints de SEP présentent un taux plasmatique d'endothéline-1 (ET-1) élevé. Nous avons rapporté que la chymase murine mMCP-4, une protéase contenue dans les granules de sécrétion des mastocytes, était impliquée dans la voie de synthèse de l'ET-1. Des études ont suggéré que les mastocytes étaient impliqués dans les phases inflammatoires se produisant au cours du développement de l'encéphalopathie auto-immune expérimentale (EAE), un modèle animal nous permettant de reproduire, chez la souris, les signes cliniques, histologiques et immunologiques que l'on retrouve chez les patients atteints de SEP.

Le but principal de l'étude était donc de montrer l'impact de la mMCP-4 *knockout* (KO) et de mesurer l'activité de cette enzyme dans la réponse hémodynamique à la big-Endothéline-1 (big-ET-1) dans la phase inflammatoire précoce de l'EAE chez la souris consciente.

Nous avons donc pu montrer que la mMCP-4 KO permettait de retarder l'apparition des premiers signes cliniques pathologiques chez nos souris soumises à l'EAE. Cette amélioration des fonctions neuromotrices est associée à une régression des lésions spinales, soit une plus grande quantité de myéline ainsi qu'une astrogliose et une microgliose moins importante. Nous avons constaté que, chez les souris de type sauvage, l'apparition des premiers symptômes s'accompagne d'une élévation des niveaux d'ET-1 cérébral endogène et de l'ARNm (ARNm) de la mMCP-4 cérébral ainsi qu'une potentialisation de la réponse pressive induite par l'administration centrale ou systémique de big-ET-1. L'étude de l'activité chymase-dépendante *in vitro* nous a permis de voir une réduction de cette activité dans les extraits mastocytaires et cérébraux des souris de type sauvage, mais pas dans les extraits pulmonaires. Chez les souris mMCP-4 KO, nous n'obtenons pas d'élévation des taux endogènes d'ET-1 ni de changement de l'activité chymase évaluée *in vitro* et *in vivo*. Toutefois nous observons chez ces souris un taux sérique de TNF- $\alpha$  plus élevé de même qu'une augmentation de l'ARNm pulmonaire de l'IL-33 et de la prépro-ET-1 en phase précoce de l'EAE.

Nous pouvons donc conclure que l'activité mMCP-4 est augmentée au niveau central et systémique au moment de la phase inflammatoire précoce chez la souris soumise à l'EAE. Nous suggérons que l'effet protecteur observé chez les souris mMCP-4 KO se produit par un mécanisme dépendant du TNF- $\alpha$  qui mène à une élévation de l'expression de la cytokine IL-33 au niveau pulmonaire.

Mots clés : chymase, ET-1, EAE, souris conscientes

## **2. TABLE DES MATIÈRES**

1.	RÉSUMÉ .....	iii
3.	LISTE DES TABLEAUX .....	ix
4.	LISTE DES FIGURES .....	x
5.	LISTE DES ABRÉVIATIONS .....	xii
6.	REMERCIEMENTS.....	xiv
7.	INTRODUCTION .....	1
7.1	MISE EN CONTEXTE DE LA PRÉSENTE ÉTUDE .....	1
7.2	LA SCLÉROSE EN PLAQUES .....	2
7.2.1	Description de la pathologie chez l'Homme .....	2
7.2.1.1	Prévalence, incidence, signes cliniques (symptômes), formes.....	2
7.2.1.2	Étiologie de la SEP .....	11
7.2.1.3	Physiopathologie .....	12
7.2.1.3.1	Les cellules immunitaires dans la SEP .....	12
7.2.1.3.2	Les cellules gliales dans la SEP .....	15
7.2.1.4	Les mastocytes .....	16
7.2.1.4.1	La maturation, l'activation et la dégranulation des mastocytes .....	16
7.2.1.4.2	Les sous-types de mastocytes.....	19
7.2.1.4.3	Rôles physiologiques et pathologiques des mastocytes .....	20
7.2.1.4.4	Les mastocytes dans le SNC .....	20
7.2.1.4.5	Les mastocytes dans la SEP .....	21
7.2.1.4.6	La chymase et l'endothéline-1.....	26
7.2.2	Traitements de la SEP .....	30
7.2.3	Modèle animal : l'encéphalopathie auto-immune expérimentale .....	31
7.3	Les cellules gliales .....	32
7.3.1	Astrocytes .....	33
7.3.1.1	Les sous-types d'astrocytes .....	33
7.3.1.2	Les rôles physiologiques des astrocytes .....	33
7.3.1.3	L'organisation cellulaire : le syncytium et ses fonctions .....	35
7.3.2	Cellules microgliales .....	37
7.3.2.1	Rôles physiologiques des cellules microgliales .....	37

7.3.3	Oligodendrocytes.....	40
7.3.3.1	La genèse des oligodendrocytes .....	40
7.3.3.2	La migration des cellules progénitrices des oligodendrocytes OPCs.....	41
7.3.3.3	La maturation des OPCs en oligodendrocytes myélinisants .....	42
7.3.3.4	Le rôle de support trophique des oligodendrocytes aux neurones .....	42
7.3.3.5	Myéline.....	45
7.4	Le système nerveux autonome.....	47
7.4.1	« Anatomie » des systèmes sympathique et parasympathique (Marieb, 2005).....	47
7.4.1.1	Anatomie et morphologie du SNA .....	48
7.4.1.2	Pharmacologie du SNA .....	49
7.4.1.3	Rôles physiologiques au niveau du système cardiovasculaire .....	52
7.4.2	Implication de l'axe endothélinergique dans le contrôle autonome.....	53
7.4.3	Effets de l'administration centrale d'ET-1 .....	55
7.4.3.1	Effets cardiovasculaires de l'administration centrale d'ET-1 .....	55
7.4.3.2	Facteurs à considérer pour l'étude de la réponse cardiovasculaire à l'administration centrale d'ET-1 .....	56
7.4.3.3	Administration centrale (i.t.c.) chez la souris.....	58
7.5	Rôles de l'interleukine 33 (IL-33) dans la SEP .....	58
7.5.1	Présentation de l'IL-33 .....	59
7.5.2	Les récepteurs de l'IL-33.....	62
7.5.3	Rôles en conditions normales et pathologiques de l'IL-33 .....	64
7.5.4	L'IL-33 dans le SNC .....	66
7.5.5	Contribution de l'IL-33 dans les maladies neurodégénératives .....	66
7.6	Le TNF- $\alpha$ .....	67
8.	QUESTION PRINCIPALE .....	71
9.	HYPOTHÈSE UNIFICATRICE .....	71
10.	BUT DE L'ÉTUDE .....	71
11.	OBJECTIFS SPÉCIFIQUES .....	71
12.	ARTICLE 1 .....	72
12.1	Titre.....	72
12.2	Auteurs de l'article.....	72
12.3	Statut de l'article .....	72

12.4	Avant-propos.....	72
12.5	Résumé en français .....	74
12.6	Manuscrit original.....	75
12.6.1	Abstract .....	76
12.6.2	Introduction .....	77
12.6.3	Material and methods .....	79
12.6.3.1	<i>Mice</i> .....	79
12.6.3.2	<i>Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)</i> .....	79
12.6.3.3	<i>Histopathology</i> .....	80
12.6.3.4	<i>Histology stains</i> .....	80
12.6.3.4.1	<i>Toluidine blue (mast cells)</i> .....	80
12.6.3.4.2	<i>Luxol fast blue (myelin)</i> .....	81
12.6.3.4.3	<i>Immunofluorescence for Iba1 (microglia) and GFAP (astrocytes)</i> ...	81
12.6.3.5	<i>Measurement of endogenous brain ET-1 levels</i> .....	82
12.6.3.6	<i>Measurement of spinal cord endogenous Interferon-gamma (IFN<math>\gamma</math>) levels</i>	82
12.6.3.7	<i>RNA extraction and quantitative RT-PCR</i> .....	82
12.6.3.8	<i>Statistical analysis</i> .....	83
12.6.4	Results .....	84
12.6.4.1	<b>Reduced impact of EAE in mMCP-4 KO mice when compared to WT congeners.</b> .....	84
12.6.4.2	<b>mMCP-4 KO mice demonstrate lower percentage of reactive gliosis after EAE.</b> .....	87
12.6.4.3	<b>mMCP-4 KO mice show higher levels of spinal cord myelin.</b> .....	91
12.6.4.4	<b>EAE increases brain mMCP-4 mRNA and ET-1 levels in WT mice.</b>	94
12.6.4.5	<b>EAE increases IFN<math>\gamma</math> levels in thoracic spinal cords.</b> .....	94
12.6.5	Discussion .....	96
12.6.6	Acknowledgements .....	99
12.6.7	Conflict of interests .....	100
12.6.8	References .....	101
12.6.9	Supplements .....	105
12.6.9.1	Supplementary Methods.....	105

12.6.9.2	Supplementary Table 1 and Figure 1 .....	106
13.	ARTICLE 2 .....	108
13.1	Titre .....	108
13.2	Auteurs de l'article .....	108
13.3	Statut de l'article .....	108
13.4	Avant-propos .....	108
13.5	Résumé en français .....	110
13.6	Manuscrit original .....	111
13.6.1	Abstract .....	112
13.6.2	Introduction .....	113
13.6.3	Material and methods .....	116
13.6.3.1	<i>Mice</i> .....	116
13.6.3.2	<i>Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)</i> .....	116
13.6.3.3	<i>RNA extraction and quantitative RT-PCR</i> .....	117
13.6.3.4	<i>Hemodynamic studies in conscious mice</i> .....	119
13.6.3.5	<i>Measurement of brain and lung endogenous TNF-<math>\alpha</math></i> .....	120
13.6.3.6	<i>Peritoneal mast cells isolation</i> .....	120
13.6.3.7	<i>Cerebral protein extraction</i> .....	121
13.6.3.8	<i>Pulmonary protein extraction</i> .....	121
13.6.3.9	<i>Measure of chymase enzymatic activity</i> .....	121
13.6.3.10	<i>Statistical analysis</i> .....	122
13.6.4	Results .....	123
13.6.4.1	<b><i>In vivo</i> response to endothelin peptides in conscious mice</b> .....	123
13.6.4.2	<b>Enzymatic activity in peritoneal mast cells, brain and lung</b> .....	127
13.6.4.3	<b>Relative mRNA expression of endothelinergetic system components</b> .....	129
13.6.4.4	<b>Relative mRNA expression of IL-33</b> .....	130
13.6.4.5	<b>Quantification of TNF-<math>\alpha</math> level</b> .....	132
13.6.5	Discussion .....	134
13.6.6	Acknowledgements .....	138
13.6.7	Authorship contributions .....	139
13.6.8	Conflict of interest .....	140

13.6.9	References .....	141
14.	DISCUSSION .....	147
14.1	Résumé des principaux résultats .....	147
14.2	Validation de l'hypothèse principale .....	147
14.3	Originalité de cette étude .....	148
14.4	Effets de la délétion génétique de la mMCP-4 dans le développement de l'EAE .....	150
14.5	Effets périphériques versus centraux .....	151
14.6	Rôle de l'IL-33 dans notre modèle .....	153
14.7	Rôle du TNF- $\alpha$ dans notre modèle .....	154
14.8	Comparatif des souris EAE délestées en mastocytes versus mMCP-4 KO .....	155
14.8.1	Avantages du KO .....	155
14.8.2	Limitation de la répression monogénique de la mMCP-4 .....	156
14.9	Avantages de mesurer l'activité chymase-dépendante chez la souris consciente saine et en EAE .....	156
14.10	Limites de la présente étude .....	157
15.	CONCLUSIONS GÉNÉRALES .....	161
16.	PERSPECTIVES .....	164
17.	LISTE DES RÉFÉRENCES .....	166
18.	LISTE DES PUBLICATIONS .....	218
18.1	Publications .....	218
18.1.1	Articles composants la thèse .....	218
18.1.2	Contribution à d'autres articles de recherche .....	218
18.1.3	Chapitre de volume .....	219
18.1.4	Revue sur invitation .....	219
18.2	Présentations orales .....	219
18.3	Présentations par affiche .....	219
19.	ANNEXE 1 .....	221
20.	ANNEXE 2 .....	222
21.	ANNEXE 3 .....	227



### 3. **LISTE DES TABLEAUX**

Tableau 1 : Rôles attribués aux mastocytes dans la SEP et dans le modèle animal EAE. ...	25
Tableau 2: Tableau supplémentaire 1 de Desbiens <i>et al.</i> (2016). .....	106

#### 4. LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Prévalence mondiale de la SEP.....	3
Figure 2 : Symptômes principaux de la SEP. ....	5
Figure 3 : Pourcentages des patients atteints de SEP selon le sexe et la forme de la maladie qu'ils présentent. ....	7
Figure 4 : Formes de la SEP. ....	10
Figure 5: Schématisation de l'implication bénéfique ou délétère des différents sous-types de cellules immunitaires impliquées dans la SEP et son modèle animal, l'EAE. ....	14
Figure 6 : Représentation schématique des récepteurs les plus connus pouvant activer les mastocytes chez l'Homme. ....	18
Figure 7 : Schématisation des rôles potentiels des mastocytes dans des pathologies neurologiques comme la SEP. ....	23
Figure 8 : Schématisation des voies de maturation de l'ET-1.....	29
Figure 9 : Représentation schématique des rôles physiologiques des astrocytes. ....	36
Figure 10 : Rôles physiologiques décrits pour les cellules microgliales en phase développementale du SNC et en phase « adulte ».....	39
Figure 11 : Schéma récapitulatif de l'implication des oligodendrocytes dans le support métabolique offert aux neurones. ....	44
Figure 12 : Comparaison entre le système nerveux somatique et le système nerveux autonome. ....	51
Figure 13 : Mécanismes proposés pour l'augmentation de l'activité de l'IL-33.....	61
Figure 14 : Signalisation et régulation négative de la signalisation de l'IL-33.....	63
Figure 15 : Rôles de la signalisation induite par l'IL-33 dans la réponse immunitaire. ....	65
Figure 16: Les voies de signalisation et rôles bioactifs des récepteurs du TNF- $\alpha$ . ....	70
Figure 17 : Figure 1 de Desbiens <i>et al.</i> (2016). ....	85
Figure 18 : Figure 2 de Desbiens <i>et al.</i> (2016). ....	86
Figure 19 : Figure 3a de Desbiens <i>et al.</i> (2016). ....	88
Figure 20 : Figure 3b de Desbiens <i>et al.</i> (2016). ....	89
Figure 21 : Figure 4 de Desbiens <i>et al.</i> (2016). ....	90
Figure 22 : Figure 5 de Desbiens <i>et al.</i> (2016). ....	92
Figure 23 : Figure 6 de Desbiens <i>et al.</i> (2016). ....	93
Figure 24 : Figure 7 de Desbiens <i>et al.</i> (2016). ....	95
Figure 25 : Figure supplémentaire 1 de Desbiens <i>et al.</i> (2016).....	107
Figure 26 : Figure 1 de Desbiens <i>et al.</i> JPET/2018/256016.....	125
Figure 27 : Figure 2 de Desbiens <i>et al.</i> JPET/2018/256016.....	126
Figure 28 : Figure 3 de Desbiens <i>et al.</i> JPET/2018/256016.....	128
Figure 29 : Figure 4 de Desbiens <i>et al.</i> JPET/2018/256016.....	131
Figure 30 : Figure 5 de Desbiens <i>et al.</i> JPET/2018/256016.....	133
Figure 31 : Schéma récapitulatif de la thèse.....	163
Figure 32 : Schématisation des scores cliniques utilisés pour l'évaluation de la progression de l'EAE chez les souris.....	221
Figure 33 : Représentation de l'implantation chirurgicale d'une puce TA11PA-C10 dans la crosse aortique d'une souris. ....	224

Figure 34 : Effets cardiovasculaires de l'administration de doses croissantes exogènes d'ET-1 chez les souris conscientes (cercles fermés) et chez les souris anesthésiées (carrés ouverts). .....	226
Figure 35 : Représentation moléculaire du TY-51469 et identification de ses fonctions physico-chimiques. ....	228
Figure 36 : Effet d'un traitement avec un inhibiteur des chymases, le TY-51469, administré par voie intrapéritonéale à raison d'une dose de 10 mg/kg deux fois par jour chez la souris de type sauvage .....	230
Figure 37 : Effet d'un traitement avec un inhibiteur des chymases, le TY-51469, administré par voie intrathécale à raison d'une dose de 1 mg/souris à tous les trois jours chez la souris de type sauvage .....	231

## 5. LISTE DES ABRÉVIATIONS

ARNm	acide ribonucléique messenger
ATP	adénosine triphosphate
big-ET-1	big-endothéline-1
BHE	barrière hémato-encéphalique
BMMC	<i>bone marrow mast cell</i>
CFA	adjuvant complet de Freund
CMH	complexe majeur d'histocompatibilité
CTMC	mastocyte du tissu conjonctif
Cx	connexine
CXCL	<i>C-X-C motif chemokine ligand</i>
DMNV	noyau moteur dorsal du nerf vague
	<i>dorsal moter nucleus of the vagus nerve</i>
EAE	encéphalopathie auto-immune expérimentale
ECE	enzyme de conversion de l'endothéline
ED <sub>50</sub>	dose effectrice médiane
ET-1	endothéline-1
FGF-2	<i>basic fibroblast growth factor</i>
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
GLUT1	transporteur de glucose 1
GPCR	récepteur couplé aux protéines G
i.c.	intra-cisternale
i.c.v.	intra-cérébro-ventriculaire
i.t.c.	intrathécale
Iba1	<i>ionized calcium binding adaptor molecule 1</i>
IL	interleukine
INF- $\gamma$	interféron-gamma
IRM	imagerie par résonnance magnétique
KO	<i>knock out</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MBP	<i>myelin basic protein</i>
MCT1	<i>monocarboxylate transporter 1</i>
MMC	mastocyte des tissus muqueux
mMCP	<i>mouse mast cell protease</i>
MOG	glycoprotéine oligodendrocytaire de la myéline
	<i>myelin oligodendrocyte glycoprotein</i>
NEP	endopeptidase neutre 24.11 (néprilysine)
NF-HEV	<i>nuclear factor from high endothelial venules</i>
NF- $\kappa$ B	<i>nuclear factor <math>\kappa</math>B</i>
NMDA	récepteur acide N-méthyl-D-aspartique
NTS	noyau du tractus solitaire
	<i>nucleus tractus solitarius</i>
OPCs	cellules progénitrices des oligodendrocytes
PAG	substance grise périaqueducatale

PAM	<i>periaqueductal grey</i>
PDGF-AA	pression artérielle moyenne
PI3K	<i>platelet growth factor AA</i>
PLP	phosphoinositide 3-kinase
PPMS	<i>proteolipid protein</i>
	sclérose en plaques progressive primaire
	<i>primary progressive multiple sclerosis</i>
PRMS	sclérose en plaques progressive récurrente
	<i>progressive remitting multiple sclerosis</i>
RC	rythme cardiaque
RRMS	sclérose en plaques poussée-rémission
	<i>relapse-remitting multiple sclerosis</i>
RVLM	médulla ventro-latérale rostrale
	<i>rostral ventrolateral medulla</i>
SCI	syndrome clinique isolé
SCF	<i>stem cell factor</i>
SEP	sclérose en plaques
SHH	<i>sonic hedgehog</i>
SNA	système nerveux autonome
SNC	système nerveux central
SPMS	sclérose en plaques progressive secondaire
	<i>secondary progressive multiple sclerosis</i>
SVZ	zone sous-ventriculaire
	<i>subventricular zone</i>
TGF- $\beta$	facteur de croissance transformant $\beta$
	<i>transforming growth factor</i>
Th	lymphocyte T auxiliaire
	<i>T helper cell</i>
TNF- $\alpha$	facteur de nécrose tumorale $\alpha$
	<i>tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i>
TNFR	récepteur du facteur de nécrose tumorale
	<i>tumor necrosis factor receptor</i>
Treg	lymphocyte T régulateur
VSM	surface ventrale de la <i>médulla oblongata</i>
	<i>ventral surface of the medulla oblongata</i>

## **6. REMERCIEMENTS**

En tout premier lieu, je voudrais remercier le Pr Pedro D'Orléans-Juste pour avoir cru en mes capacités et m'avoir accueillie dans son laboratoire de recherche. Son encadrement m'a permis de me réaliser en tant que scientifique et il a largement contribué à mon développement intellectuel ainsi qu'à accroître mon esprit critique et analytique.

J'aimerais également remercier le Pr Denis Gris et son étudiante au doctorat Marjan Gharagozloo qui ont permis, grâce à leur expertise en EAE, de rendre possible ce projet de recherche. De même que le Pr Louis Gendron pour son aide avec le volet injection intrathécale sans quoi il n'aurait pas été possible de réaliser la deuxième partie de mon projet de recherche.

Merci également à mes collègues de travail : Catherine Lapointe, Hanène Touil et Laurence Vincent. Leur aide avec les expérimentations m'a été bien utile et leur simple présence dans le laboratoire a contribué à rendre l'ambiance de travail fort agréable.

Un merci beaucoup moins scientifique à mes parents, Claire & Mario, ainsi qu'à ma sœur Natacha et à mes neveux Charle et Maxime. Une mention spéciale aussi à mon père pour son aide avec la création artistique des schémas des scores cliniques et du récapitulatif présentés dans cette thèse. Merci également à ma très chère amie Laetiscia qui a toujours été là pour me supporter moralement malgré les bas rencontrés lors de la réalisation de mon doctorat.

Finalement, je voudrais remercier les Prs Réjean Couture, Alain Frigon, Klaus Klarskov et Pedro D'Orléans-Juste pour avoir accepté de lire, commenter et corriger ma thèse.

## **7. INTRODUCTION**

### **7.1 MISE EN CONTEXTE DE LA PRÉSENTE ÉTUDE**

La sclérose en plaques (SEP) est une maladie neurodégénérative qui demeure à ce jour incurable. L'étiologie de cette pathologie n'est en effet toujours pas bien comprise. On retrouve, toutefois, de nombreux consensus dans la littérature, comme l'implication des cellules immunitaires en interactions complexes avec les cellules gliales et les neurones dans des conditions inflammatoires. Dans un contexte d'évènements physiopathologiques très complexes, des études contradictoires concernant l'implication des mastocytes dans cette maladie ont été publiées. De plus, la SEP a été associée à plusieurs comorbidités cardiovasculaires liées à des altérations de la fonction cardiaque malgré une conservation de l'intégrité vasculaire et endothéliale. Certaines études ont montré une élévation des niveaux plasmatiques de l'endothéline-1 (ET-1) chez les patients atteints de la SEP. Ainsi dans le cadre de mon doctorat, nous nous sommes intéressés à l'implication d'une protéase mastocytaire, soit la mMCP-4 qui se trouve être l'homologue murin de la chymase humaine en termes d'activité enzymatique et de localisation cellulaire, dans le développement de la pathologie dans un modèle de souris de SEP. Ainsi dans notre modèle animal, nous avons étudié, grâce à la délétion génétique de notre enzyme d'intérêt, la progression de la maladie chez nos souris. Nous nous sommes également intéressés aux évènements cellulaires se produisant lors des premières phases de la pathologie. Ainsi nous avons procédé à l'évaluation du niveau de cellules microgliales et d'astrocytes actives suite à l'immunisation des souris, de même qu'au niveau de myéline spinale quantifiée chez nos deux groupes à l'étude, soit les souris de type sauvage et les souris mMCP-4 KO. La chymase mMCP-4 étant très bien démontrée dans le processus de maturation de l'ET-1, nous avons évalué les quantités de ce peptide retrouvé au niveau central. Finalement, étant donné les effets vasoconstricteurs importants de l'ET-1 et les comorbidités cardiovasculaires décrites chez les patients atteints de SEP, nous avons aussi exploré l'impact de cette maladie au niveau des paramètres cardiovasculaires chez la souris consciente.

## 7.2 LA SCLÉROSE EN PLAQUES

### 7.2.1 Description de la pathologie chez l'Homme

#### 7.2.1.1 Prévalence, incidence, signes cliniques (symptômes), formes

La SEP est un désordre neurodégénératif auto-immun. Selon une étude menée par Statistique Canada entre 2009 et 2013, près de 100000 Canadiens(ne)s sont atteints de cette pathologie (Bray, *et al.*, 2014). Le Canada est le pays où il y a la plus grande prévalence de la SEP dans le monde (Figure 1) (Rosati, 2001; MSIF, 2013; Goodin, 2014; Leray, *et al.*, 2016; SCSP, 2018a). La SEP touche en moyenne 2 à 3 fois plus les femmes que les hommes (MSIF, 2013; Goodin, 2014) et est généralement diagnostiquée entre 20 et 45 ans (Goodin, 2016), bien qu'elle se manifeste également chez des enfants ou des adultes de plus de 45 ans (SCSP, 2018a).



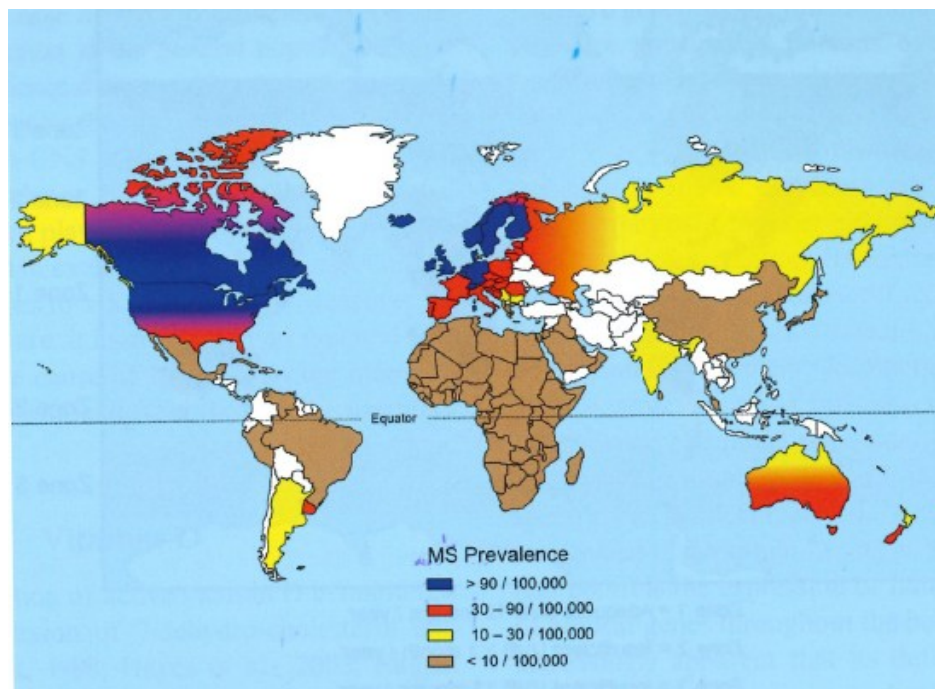


Figure 1 : Prévalence mondiale de la SEP.

[Figure 11.3 de (Goodin, 2014) reproduite avec la permission].

Les pays en bleu sur la carte représentent ceux pour lesquels la prévalence mondiale de la SEP est la plus importante avec plus de 90 malades / 100000 habitants, suivi des pays en rouge (entre 30 et 90 malades / 100000 habitants), en jaune (entre 10 et 30 malades / 100000 habitants) et en bruns (moins de 10 malades / 100000 habitants). Les pays en blanc sur la carte sont ceux pour lesquels il n'y a pas de données disponibles.

Cette pathologie résulte d'une attaque et d'une destruction de la myéline entourant et protégeant les axones des neurones par les cellules immunitaires. Cette démyélinisation mène à un ralentissement ou à un blocage de la conduction saltatoire neuronale. Cette mauvaise conduction des influx nerveux dérègle la communication au niveau du système nerveux central (SNC), ce qui cause une pléthore de symptômes et de signes cliniques neurologiques (Figure 2) (Lublin, 2005; Huang, *et al.*, 2016).

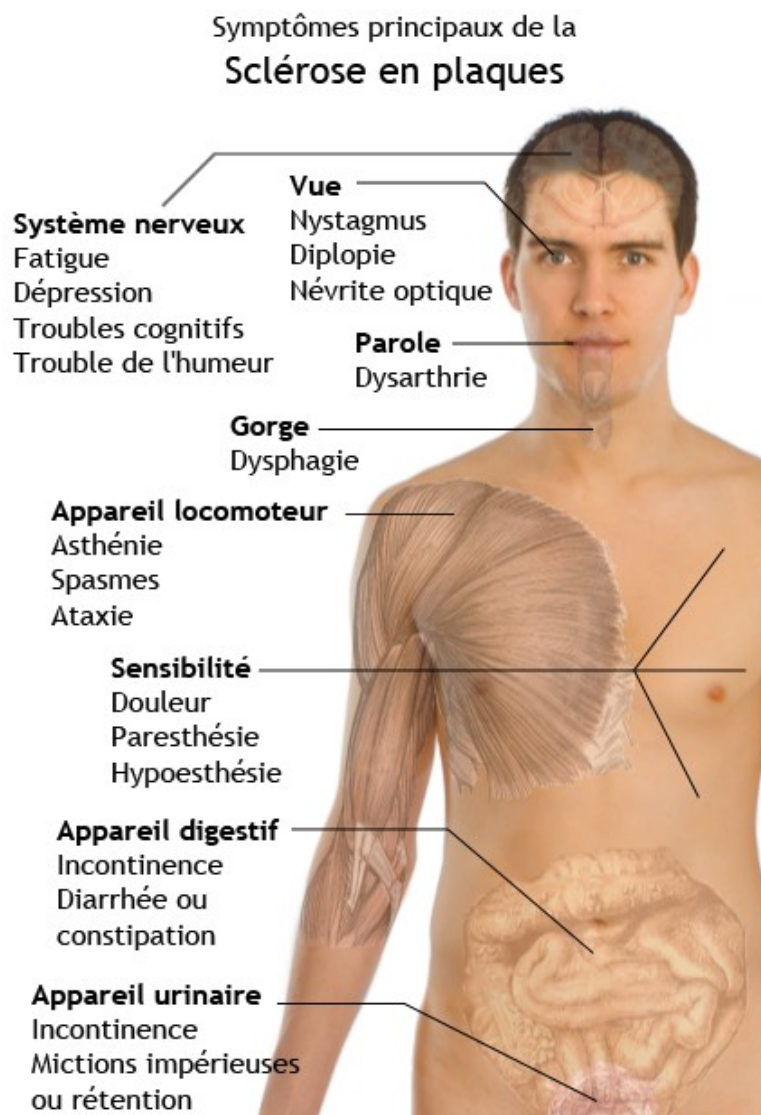


Figure 2 : Symptômes principaux de la SEP.

Tiré du site internet : <http://asprs.qc.ca/sclerose-en-plaques/symptomes/>

On distingue 5 formes de la maladie dont la distribution est inégale (Figure 3) : le syndrome clinique isolé (SCI), la sclérose en plaques récurrente-rémittente aussi appelée forme cyclique ou poussées-rémissions (*relapsing-remitting multiple sclerosis* : RRMS), la sclérose en plaques progressive secondaire (*secondary progressive multiple sclerosis* : SPMS), la sclérose en plaques progressive primaire (*primary progressive multiple sclerosis* : PPMS) et la sclérose en plaques progressive récurrente (*progressive-relapsing multiple sclerosis* : PRMS) (Koskie, 2018; SCSP, 2018b).

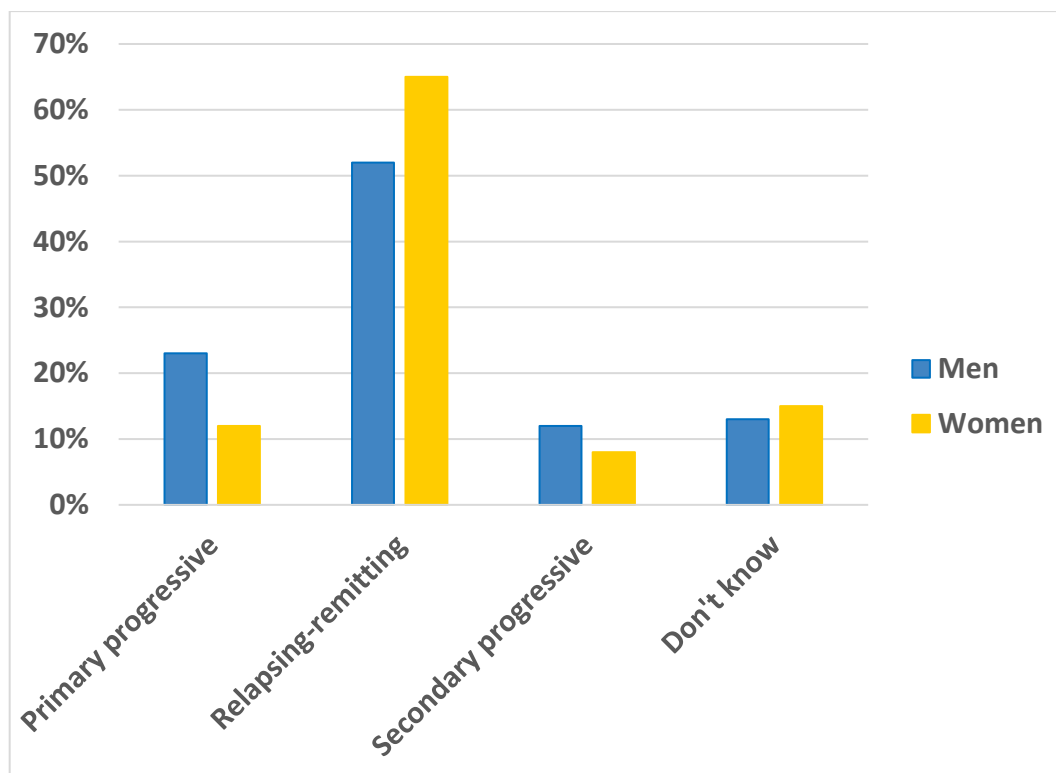


Figure 3 : Pourcentages des patients atteints de SEP selon le sexe et la forme de la maladie qu'ils présentent.

[Figure 1 de (Ford, *et al.*, 2012) provenant d'une source « *open access* » ne nécessitant pas de permission particulière pour la reproduction].

- Le syndrome clinique isolé (SCI)

Il s'agit de la forme précoce de la pathologie se définissant en un seul épisode dont les symptômes neurologiques s'apparentent à la SEP (Figure 4a).

- La SEP récurrente-rémittente

Cette forme, également connue sous forme cyclique (poussées-rémissions), est le type d'évolution de cette maladie la plus fréquente (60%) (Ford, *et al.*, 2012). Elle est caractérisée par des poussées inflammatoires et immunitaires pouvant mener à l'apparition de nouveaux symptômes ou à l'aggravation de ceux préexistants. Ces poussées sont ensuite suivies de périodes de rémission complète ou partielle, c'est-à-dire une période où l'on observe une disparition ou une atténuation des symptômes neurologiques, de plus ou moins longue durée (Figure 4b).

- La SEP progressive secondaire

Généralement la forme RRMS évolue vers la forme progressive secondaire. Cette dernière se définit lorsque les cycles de poussées et de rémissions deviennent de moins en moins précis. Ainsi la maladie va suivre une progression continue qui peut parfois présenter des phases plateaux (Figure 4c et Figure 4d). L'évolution vers cette forme de SEP mène peu à peu à la perte des capacités neuromotrices des patients. Chez près de la moitié des personnes présentant la RRMS, l'aggravation des symptômes s'observera dans les dix à vingt ans suite au diagnostic.

- La SEP progressive primaire

On retrouve cette forme chez environ 10% des gens atteints de SEP. Celle-ci se caractérise par une accumulation continue d'incapacités, sans présenter de poussées à proprement parler. Les patients peuvent parfois présenter une stabilisation ou une brève amélioration, mais contrairement à la forme RRMS la SEP progressive primaire ne comporte pas de phase de rémission (Figure 4e et Figure 4f).

- La SEP progressive récurrente

Il s'agit de la forme la plus rare de la SEP, seulement 5% des cas. Dans cette forme de la maladie, les patients voient une accumulation et une aggravation de leurs symptômes dès le diagnostic, mais présentent également des épisodes de poussées bien définis qui peuvent être suivis, ou pas, de rémissions (Figure 4g et Figure 4h).

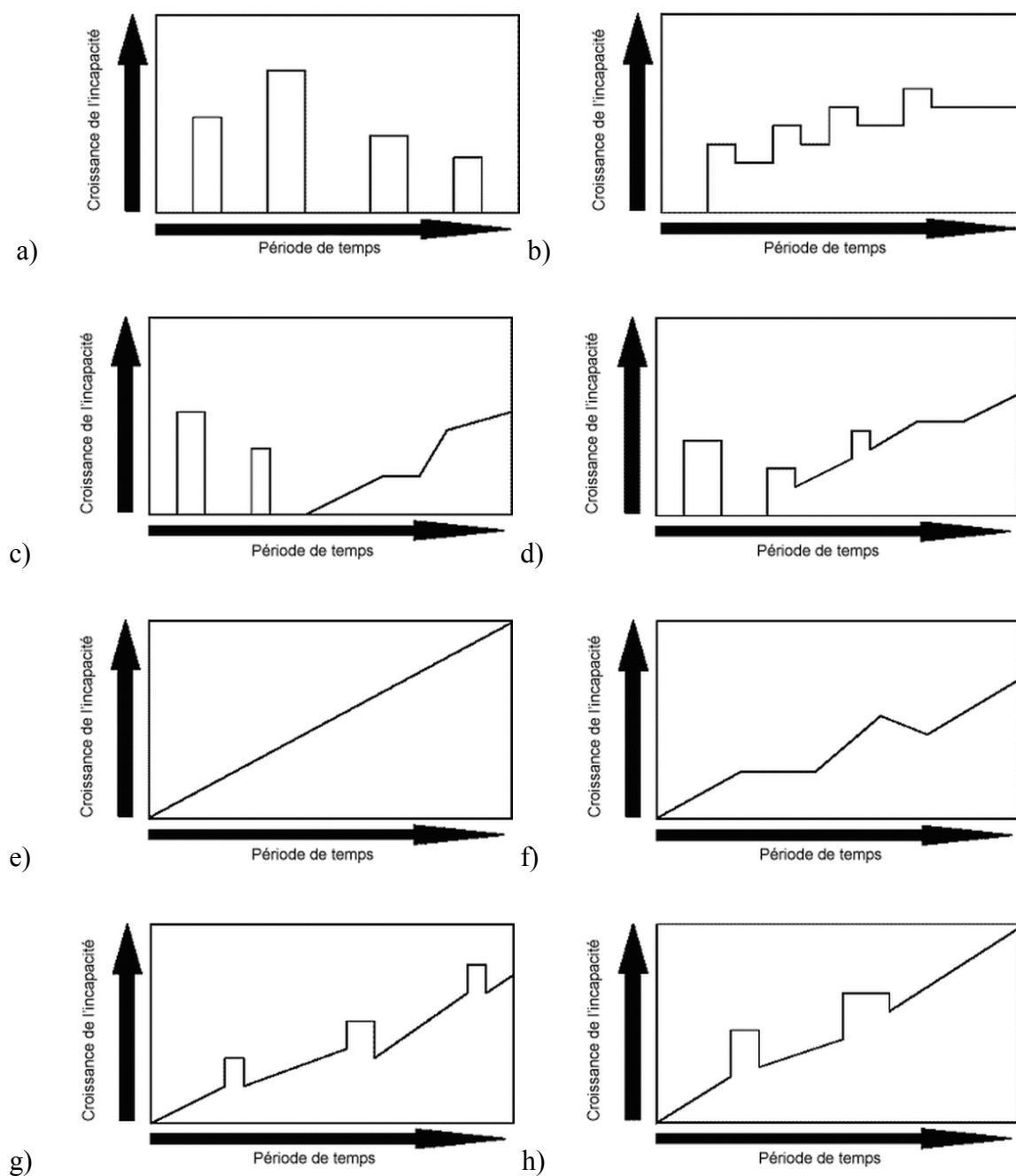


Figure 4 : Formes de la SEP.

[tirées de (SCSP, 2018b)].

a) SCI, b) SEP récurrente-rémittent, c) et d) SEP progressive secondaire, e) et f) SEP progressive primaire et g) et h) SEP progressive récurrente.



### 7.2.1.2 Étiologie de la SEP

L'étiologie de la SEP n'est toujours pas connue. Toutefois, des évidences expérimentales ont mené à des consensus décrivant certains aspects de la physiopathologie. Ces consensus incluent l'implication des cellules immunitaires dans une réponse anormale visant le soi (d'où l'appellation auto-immunitaire), l'implication d'un environnement pro-inflammatoire au niveau du SNC (Huang, *et al.*, 2016) ainsi qu'une altération des propriétés de la barrière hématoencéphalique (BHE) (D'Haeseleer, *et al.*, 2011). Contrairement à plusieurs autres pathologies neurodégénératives, la SEP n'est pas le fait d'une mutation génétique, bien que certains variants génétiques puissent augmenter la susceptibilité d'une personne à développer la maladie (Sawcer, *et al.*, 2014). Des facteurs environnementaux ont aussi été ciblés comme facteurs de risque pouvant augmenter la susceptibilité de développer la maladie. Ceux-ci incluent la latitude géographique du lieu de résidence (Koch-Henriksen et Sorensen, 2010), l'exposition au tabac (Hernan, *et al.*, 2001; Riise, *et al.*, 2003; Ascherio et Munger, 2007b), l'obésité (Munger, *et al.*, 2009; Munger, *et al.*, 2013), la composition du microbiote intestinal (Berer, *et al.*, 2011; Berer, *et al.*, 2017; Cekanaviciute, *et al.*, 2017) et l'infection à certains virus (Ascherio et Munch, 2000; Sewell, *et al.*, 2002; Ascherio et Munger, 2007a). Toutefois, les mécanismes par lesquels ces divers facteurs ont un impact sur le développement de la SEP demeurent inconnus.

Pour le moment, le seul outil diagnostique fiable de la SEP est l'imagerie par résonance magnétique (IRM) (Rovira, *et al.*, 2015; Traboulsee, *et al.*, 2016). Les plaques de démyélinisation inflammatoire sont facilement visibles en IRM puisqu'il y a un changement de la perméabilité de la BHE dès les premières phases de développement de la maladie (Reich, *et al.*, 2018). Les tendances actuelles mènent à l'utilisation de l'imagerie pour étudier la pathogenèse et la pathologie en général. En effet, l'IRM permet d'évaluer l'inflammation périvasculaire, le développement de lésions corticales et spinales, la perte et la régénération de la myéline, l'activation du système immunitaire inné, l'inflammation leptoméningée et les fonctions cognitives (Absinta, *et al.*, 2016). La quantification des chaînes légères des neurofilaments au niveau du liquide céphalo-rachidien et sérique semble être prometteur pour la détermination des processus pathologiques axonaux (Kuhle, *et al.*, 2016; Siller, *et al.*, 2018) mais pour le moment aucun marqueur sanguin ou au niveau du liquide

céphalo-rachidien n'est assez spécifique et sensible pour être utilisé comme outil diagnostique en clinique (Housley, *et al.*, 2015).

### 7.2.1.3 Physiopathologie

Les dommages tissulaires résultent d'interactions complexes entre le système immunitaire, les cellules gliales et les neurones. La SEP est caractérisée par une infiltration focale des lymphocytes et de macrophages qui vont ensuite attaquer la gaine de myéline entourant les axones des neurones et entraîner des dommages axonaux (Cheng, *et al.*, 2017). Il y a toujours débat à savoir si la pathologie tire son origine directement au niveau du SNC ou plutôt par un effet au niveau périphérique.

#### 7.2.1.3.1 Les cellules immunitaires dans la SEP

Certaines hypothèses semblent toutefois être largement acceptées, par exemple que les cellules T auto-réactives contre la myéline pénètrent dans le SNC pour initier et propager la réponse inflammatoire chronique. Sous l'action de diverses cytokines et récepteurs, les cellules T vont se différencier. Les Th1 et les Th17, de par la relâche de facteurs comme l'interféron- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), le facteur de nécrose tumorale (*tumor necrosis factor* : TNF- $\alpha$ ), l'interleukine (IL) -17, l'IL-21 et l'IL-22, vont participer activement à la création d'un environnement pro-inflammatoire, à la promotion de l'infiltration cellulaire au niveau du SNC, à la promotion de l'expression de molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I, au changement de perméabilité de la BHE et provoquer des dommages axonaux (Korn, *et al.*, 2009; Mesquita, *et al.*, 2009; O'Brien, *et al.*, 2010; Rostami et Ciric, 2013). D'un autre côté, les cellules Th2 et Treg vont avoir des effets opposés, c'est-à-dire qu'elles vont relâcher des facteurs anti-inflammatoires comme l'IL-4, l'IL-5, l'IL-10 et l'IL-13 ou des médiateurs immunosuppresseurs permettant de limiter l'inflammation, d'inhiber les cellules T auto-réactives ou de limiter la capacité des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) et donc fournir au SNC une protection contre la réponse auto-immune et contre les dommages axonaux (Mosmann et Sad, 1996; Schmidt, *et al.*, 2012; Buc, 2013; Duffy, *et al.*, 2014; Fernando, *et al.*, 2014; Abdolahi, *et al.*, 2015).

Les cellules B semblent également impliquées dans la pathogenèse de la SEP et dans son modèle expérimental, l'encéphalopathie auto-immune expérimentale (EAE). La production d'auto-anticorps spécifiques pour les protéines formant la myéline est associée avec la démyélinisation dans l'EAE et la SEP (Lalive, 2008). De plus, les cellules B peuvent sécréter des cytokines, comme l'IL-6 pouvant influencer la prolifération des cellules T (Bar-Or, *et al.*, 2010; Barr, *et al.*, 2012) et la différenciation des cellules Treg (Mauri et Bosma, 2012) ou avoir un impact anti-inflammatoire par la production et la sécrétion d'IL-10 (Ireland, *et al.*, 2015; Cheng, *et al.*, 2017).

Les macrophages, qu'ils proviennent de la périphérie ou résident du SNC, ont également été montrés comme bénéfiques et délétères dans la pathogenèse selon qu'ils présentent le type M1, ou macrophage activé par voie classique, ou le type M2, ou macrophage activé par voie alternative (Mantovani, *et al.*, 2004; Kigerl, *et al.*, 2009; McWhorter, *et al.*, 2015). Les macrophages de type M1 peuvent contribuer à la formation des lésions et des dommages axonaux par la présentation de molécules du CMH de classe II à leur surface, par le recrutement de cellules T au niveau du SNC, par la relâche de cytokines et molécules pro-inflammatoires comme l'IL-1 $\beta$ , l'IL-12, le TNF- $\alpha$ , le monoxyde d'azote (NO) et des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Hendriks, *et al.*, 2005; Jiang, *et al.*, 2014). Alors que les macrophages de type M2 vont plutôt contribuer à l'amélioration des signes cliniques par la production de facteurs neurotrophiques, de molécules anti-inflammatoires comme l'IL-10, l'IL-13 et l'IL-4 et par la clairance des débris de myéline et la promotion de la remyélinisation (Weber, *et al.*, 2007; Tierney, *et al.*, 2009; Jiang, *et al.*, 2012; Ruckh, *et al.*, 2012; Miron, *et al.*, 2013; Jiang, *et al.*, 2014).

La Figure 5 présente un schéma récapitulatif de quelques rôles des différents sous-types de cellules immunitaires reconnus dans la SEP.

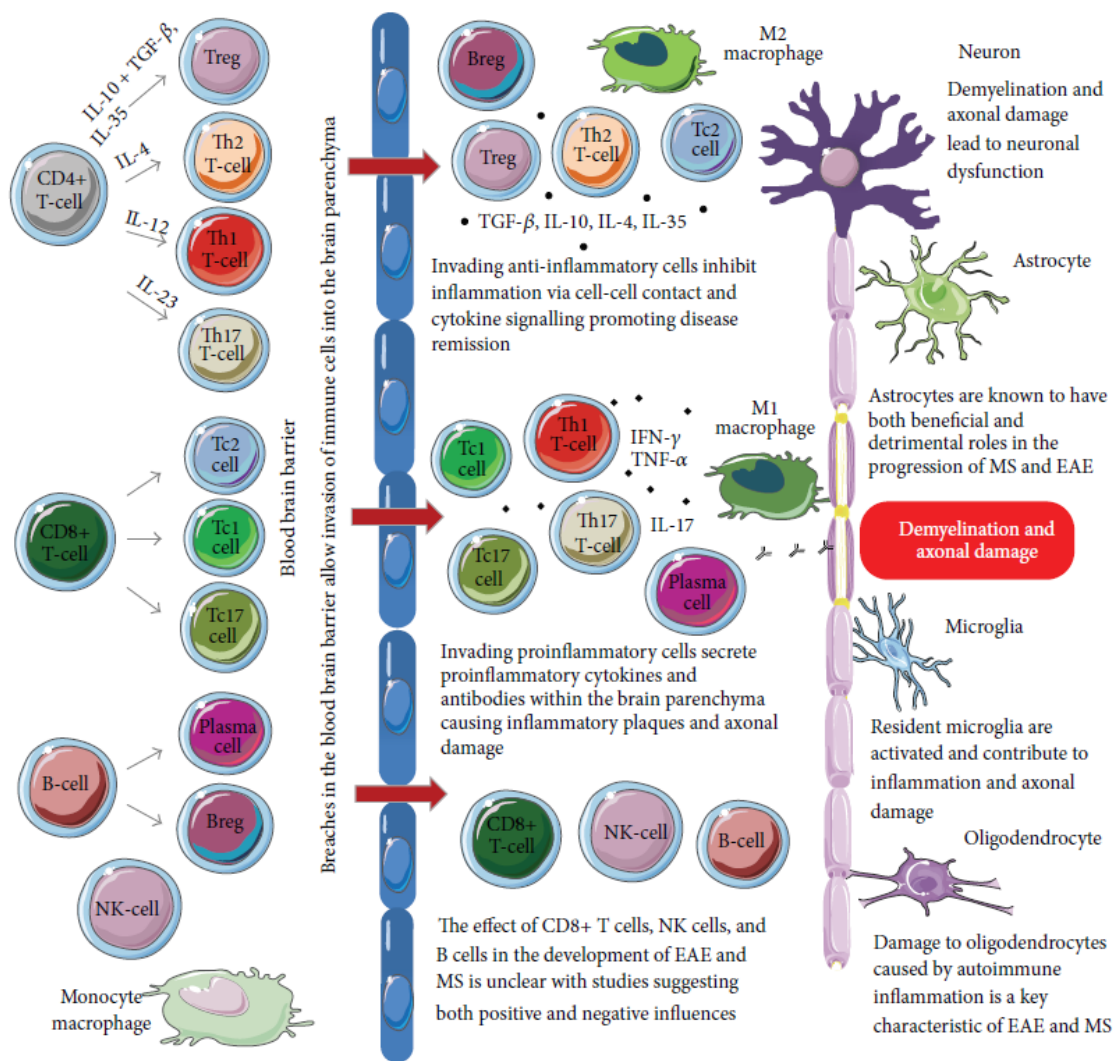


Figure 5: Schématisation de l'implication bénéfique ou délétère des différents sous-types de cellules immunitaires impliquées dans la SEP et son modèle animal, l'EAE.

[Figure 1 de (Duffy, *et al.*, 2014) provenant d'une source « *open access* » ne nécessitant pas de permission particulière pour la reproduction].

#### 7.2.1.3.2 Les cellules gliales dans la SEP

Les cellules gliales, dont il sera discuté plus en détail dans la section 3 ci-après, ont également un rôle direct dans le SEP. En effet on observe une microgliose importante au niveau de la matière blanche des patients SEP (Jack, *et al.*, 2005; Luo, *et al.*, 2017). Ces cellules sont les phagocytes résidents du SNC. Elles peuvent avoir des effets bénéfiques, comme par la clairance des débris de myéline ou dans l'élagage des synapses dysfonctionnelles ou alors avoir des effets délétères par la promotion de l'inflammation au niveau central (Jack, *et al.*, 2005; Luo, *et al.*, 2017). On observe également une astrogliose importante au niveau des plaques sclérotiques. Ces cellules peuvent également être bénéfiques ou délétères selon qu'elles relâchent des facteurs pro-inflammatoires, qu'elles promeuvent une expression aberrante des protéines du complément au niveau des synapses, les rendant sensibles à la dégradation par les cellules microgliales, qu'elles assurent une recapture du glutamate superflu ou qu'elles assurent un support métabolique axonal et un maintien de la BHE (Moreno, *et al.*, 2013; Correale et Farez, 2015; Liddel, *et al.*, 2017; Ponath, *et al.*, 2018). On observe également un échec à la remyélinisation par les oligodendrocytes nouvellement différenciés en oligodendrocytes myélinisants à partir des cellules progénitrices des oligodendrocytes (*oligodendrocyte progenitor cells* : OPCs) (Franklin et Goldman, 2015). Les oligodendrocytes peuvent eux-mêmes participer à la relâche de facteurs pro-inflammatoires (Dimou et Gallo, 2015; Kitic, *et al.*, 2017; Reich, *et al.*, 2018). Puis lorsqu'ils deviennent dysfonctionnels et meurent, ils contribuent aux dommages tissulaires et à la perte du support trophique des axones. Les axones dénudés deviennent vulnérables et on observe alors une dégénération lente. Cette dégénérescence axonale peut avoir plusieurs mécanismes comme une réduction du transport axonal, une dysfonction mitochondriale et une augmentation de la demande énergétique. En effet, avec la démyélinisation, les neurones doivent faire fonctionner plus de canaux ioniques pour la transmission de l'influx nerveux (Mahad, *et al.*, 2015). De plus, la conduction saltatoire est compromise, puisque la myéline qui permet l'accélération de la conduction neuronale est détruite. La démyélinisation entraîne également la perte du support métabolique par les oligodendrocytes et les astrocytes environnants.

#### 7.2.1.4 Les mastocytes

D'abord décrits par Paul Ehrlich en 1878, les mastocytes ont été exhaustivement étudiés au niveau de leur rôle dans les réactions allergiques, en particulier en lien avec la présence d'histamine dans leur contenu granulaire et leur activation immunologique dépendante du récepteur FcεRI (Riley et West, 1952; Kinet, 1999; Siraganian, 2003; da Silva, *et al.*, 2014). Il est maintenant reconnu que ces cellules ont des implications beaucoup plus larges et complexes chez les individus sains dont la réparation tissulaire, la cicatrisation, l'angiogenèse, l'immunité innée, adaptative et la tolérance immunologique (da Silva, *et al.*, 2014).

Dans le cadre de l'étude présente, nous nous intéressons particulièrement aux mastocytes puisque ce sont ces cellules qui produisent notre enzyme d'intérêt, soit la protéase mastocytaire de type 4 (mMCP-4) dont il sera discuté plus en détails un peu plus loin dans cette introduction.

##### 7.2.1.4.1 La maturation, l'activation et la dégranulation des mastocytes

La maturation des mastocytes, à partir des cellules d'origine hématopoïétique (Fodinger, *et al.*, 1994; Chen, *et al.*, 2005; Jamur, *et al.*, 2005), mène à différents phénotypes qui dépendent du microenvironnement dans lequel celle-ci se produit. En effet contrairement aux autres types cellulaires d'origine hématopoïétique, la maturation finale des mastocytes se produit dans les tissus périphériques dans lesquels ils s'installent. Il est reconnu que ce sont les précurseurs immatures (*bone marrow mast cells* : BMMC) qui migrent depuis la moelle osseuse bien que les mécanismes responsables du recrutement des cellules progénitrices dans les tissus périphériques en conditions normales ou inflammatoires ne soient pas encore très bien compris (Kitamura, *et al.*, 1993; Hallgren et Gurish, 2007). Les études sur les facteurs de migration sont complexes puisque la migration dépend de l'expression, à la surface des cellules progénitrices, de différents récepteurs de chimio-attraction et de molécules d'adhésion et est influencée par le degré de maturation, le tissu cible et les cytokines et facteurs de croissance du microenvironnement (Collington, *et al.*, 2011). Les différences phénotypiques qui surviennent suite à la maturation mastocytaire

au sein des différents tissus se traduisent par l'expression de différents récepteurs de surface susceptibles de mener à l'activation cellulaire et à la dégranulation, de même qu'à l'expression de différents médiateurs dans leur contenu granulaire pouvant être relâchés dans le milieu lorsque les cellules sont activées (Galli, *et al.*, 2011; Jamur et Oliver, 2011). Cette activation est possible grâce aux nombreux récepteurs présents à la surface des cellules mastocytaires, dont une représentation schématique de quelques-uns des plus fréquents se trouve à la Figure 6 (Tkaczyk, *et al.*, 2004; Gilfillan, *et al.*, 2009; da Silva, *et al.*, 2014).

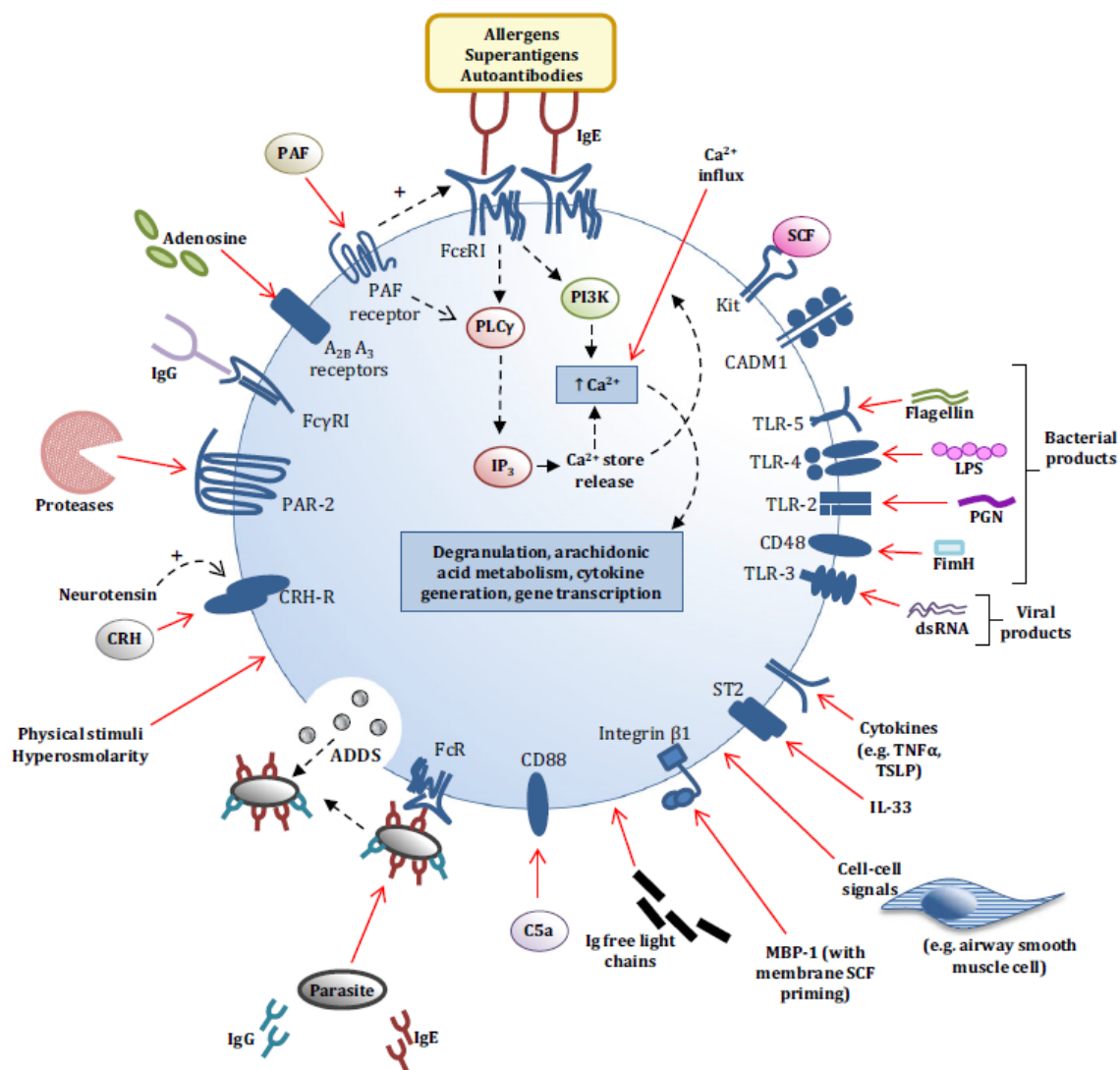


Figure 6 : Représentation schématique des récepteurs les plus connus pouvant activer les mastocytes chez l'Homme.

[Figure 8 de (Bradding et Arthur, 2016) reproduite avec la permission].



Les mastocytes peuvent donc relâcher les différents médiateurs contenus dans leurs granules de sécrétion suite à leur activation par voie immunologique ou non-immunologique. Cette sécrétion se produit soit par dégranulation, c'est-à-dire que la granule fusionne avec la membrane plasmique suite à une mobilisation de calcium intracellulaire afin de relâcher les médiateurs préformés dans l'environnement extracellulaire, soit par trans-granulation via les interactions cellule-cellule (Greenberg et Burnstock, 1983; Dines et Powell, 1997; Wilhelm, *et al.*, 2005; Wernersson et Pejler, 2014; Vukman, *et al.*, 2017). Les mastocytes peuvent également relâcher des médiateurs synthétisés *de novo* comme des eicosanoïdes, des cytokines et des chimiokines (da Silva, *et al.*, 2014).

#### 7.2.1.4.2 Les sous-types de mastocytes

Les mastocytes ont d'abord été décrits à cause de leur particularité de contenir des granules de sécrétion dans leur cytoplasme. Ces granules contiennent des médiateurs préformés comme l'histamine et la sérotonine, des protéases comme la tryptase, la chymase et la carboxypeptidase A, des cytokines et des facteurs de croissance dont le profil est très variable en fonction du microenvironnement dans lequel évolue le mastocyte ainsi que selon l'espèce animale à l'étude (da Silva, *et al.*, 2014). Deux « types » de mastocytes ont été décrits chez la souris, soit les mastocytes des tissus muqueux (*mucosal mast cells* : MMC) présent dans l'épithélium pulmonaire et du tractus gastro-intestinal et les mastocytes des tissus conjonctifs (*connective tissue mast cells* : CTMC) retrouvés dans la sous-muqueuse intestinale, le péritoine et la peau. Les MMC contiennent seulement des protéases de type tryptase, soit les *mouse mast cell protease* (mMCP)-1 et mMCP-2, empaquetées dans des granules de sécrétion avec des protéoglycanes dont entre autres des chaînes de sulfate de chondroïtine qui ont la particularité de sécréter peu d'histamine. Les CTMC contiennent la chymase mMCP-4, la tryptase mMCP-6 et la carboxypeptidase A emmagasinées dans les granules de sécrétion par des protéoglycanes telles des chaînes d'héparine et peuvent relâcher une grande quantité d'histamine (Yurt, *et al.*, 1977; Enerback, *et al.*, 1985; Metcalfe, *et al.*, 1997; Welle, 1997; Miller et Pemberton, 2002; Pejler, *et al.*, 2010; Wernersson et Pejler, 2014). Il faut toutefois noter que ces cellules sont en constant changements selon les signaux reçus depuis l'environnement dans lequel elles évoluent, ce qui rend la classification

beaucoup plus complexe, mais qui ne fera pas l'objet de cette thèse [voir (da Silva, *et al.*, 2014) pour une revue de littérature à ce sujet].

#### 7.2.1.4.3 Rôles physiologiques et pathologiques des mastocytes

La distribution tissulaire des mastocytes est très vaste, on les retrouve plus particulièrement dans les milieux susceptibles d'être en contact avec l'extérieur comme la peau, les muqueuses et les tissus connectifs comme les vaisseaux sanguins et les nerfs (Metcalf, *et al.*, 1997; Galli, *et al.*, 2005; da Silva, *et al.*, 2014). Ils possèdent la capacité de « communiquer » avec plusieurs autres types cellulaires en conditions normales. Ces divers rôles et cette faculté d'influencer les autres cellules environnantes par la relâche de médiateurs variés doivent être finement régulés et un déséquilibre fait en sorte que les mastocytes sont décrits dans diverses pathologies comme les allergies chroniques, les désordres inflammatoires, les maladies auto-immunes et les cancers (Rao et Brown, 2008).

#### 7.2.1.4.4 Les mastocytes dans le SNC

Les mastocytes sont connus pour être des cellules résidentes du SNC, généralement près de vaisseaux sanguins (Silver, *et al.*, 1996; Skaper, *et al.*, 2012), dans les méninges, l'*area postrema*, le plexus choroïde et le parenchyme des régions thalamique et hypothalamique (Kim, *et al.*, 2010; Nelissen, *et al.*, 2013; Dong, *et al.*, 2014b), et possèdent la capacité de traverser la BHE lorsque nécessaire (Silverman, *et al.*, 2000; Skaper, *et al.*, 2014). Ils sont reconnus pour être en « communication » avec les cellules gliales, les neurones et les cellules endothéliales (Silver et Curley, 2013; Dong, *et al.*, 2014b). Les mastocytes collaborent avec les neurones dans un système de communication bidirectionnelle semblable à la structure synaptique grâce à des molécules d'adhésion (Suzuki, *et al.*, 2004; Furuno, *et al.*, 2005) afin d'assurer un contrôle neuro-immunologique de certaines fonctions centrales et périphériques (Van Nassauw, *et al.*, 2007; Nautiyal, *et al.*, 2012; da Silva, *et al.*, 2014).

#### 7.2.1.4.5 Les mastocytes dans la SEP

Les mastocytes ont été montrés dans les lésions du SNC de patients atteints de SEP dès les années 1890 (Ribatti, 2015) et leur nombre et distribution corrélient avec la sévérité de la maladie (Toms, *et al.*, 1990; Couturier, *et al.*, 2008; Yu, *et al.*, 2015). Les mastocytes sont également un type cellulaire reconnu dans la réponse immunitaire que l'on retrouve physiologiquement au niveau du SNC. Ces cellules ont un rôle dans la physiopathologie de la SEP, quoique celui-ci soit sous-estimé (Elieh-Ali-Komi et Cao, 2017). Au cours de la neuro-inflammation, les mastocytes participent activement, par des mécanismes directs et indirects, à la neurogénèse, à la neurodégénération et à la perméabilité de la BHE en catalysant et en amplifiant les réponses cellulaires et moléculaires (Figure 7). Ils peuvent par exemple influencer la différenciation des cellules T via la relâche de diverses cytokines comme l'IL-4, l'IL-10, l'IL-13, le facteur de croissance transformant  $\beta$  (*transforming growth factor* : TGF- $\beta$ ), le TNF- $\alpha$  et l'IL-6 ou d'autres facteurs pouvant influencer la maturation des cellules T et les cellules dendritiques comme l'IL-4, l'IL-12, l'IL-15, le TNF- $\alpha$  ou des molécules comme le CD154 et l'OX40L (Gregory, *et al.*, 2005; Gandhi, *et al.*, 2010). Ils peuvent également avoir un effet direct par la relâche de médiateurs comme l'histamine ou des protéases comme la tryptase et la chymase qui vont modifier la perméabilité de la BHE ou interagir avec la myéline et contribuer à sa dégradation (Johnson, *et al.*, 1988; Dietsch et Hinrichs, 1991; Tchougounova, *et al.*, 2005; Medic, *et al.*, 2008; Lu, *et al.*, 2010; Christy, *et al.*, 2013). Des évidences expérimentales ont également montré que les mastocytes se retrouvent, avec les infiltrations de cellules immunitaires, au niveau des lésions périvasculaires, du parenchyme et des leptoméniges des patients SEP (Toms, *et al.*, 1990; Ibrahim, *et al.*, 1996). De plus, ces patients ont des niveaux élevés de tryptase et d'histamine dans leur liquide céphalo-rachidien (Rozniecki, *et al.*, 1995; Theoharides, *et al.*, 2007; Kallweit, *et al.*, 2013). Démontrant ainsi un rôle actif des mastocytes résidents, mais également des mastocytes périphériques dans la SEP et dans l'EAE (Tanzola, *et al.*, 2003). Ce rôle reste encore à bien définir puisque des études utilisant des souris déplétées en mastocytes ont mené à des résultats controversés où certains groupes de recherche ont vu une amélioration des scores cliniques et d'autres une détérioration chez ces animaux selon le protocole expérimental et la souche de souris utilisée (Secor, *et al.*, 2000; Bennett, *et al.*,

2009; Sayed, *et al.*, 2010; Feyerabend, *et al.*, 2011; Li, *et al.*, 2011; Piconese, *et al.*, 2011; Sayed, *et al.*, 2011; Costanza, *et al.*, 2012).

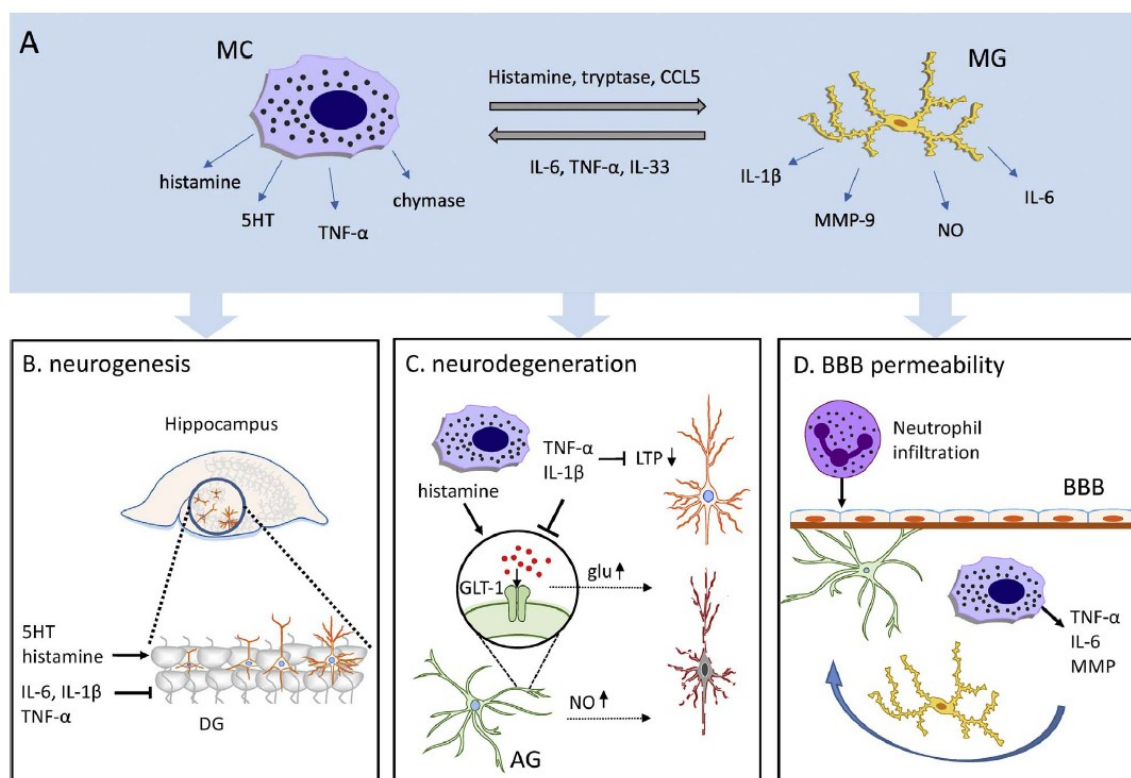


Figure 7 : Schématisation des rôles potentiels des mastocytes dans des pathologies neurologiques comme la SEP.

[Figure 1 de (Hendriksen, *et al.*, 2017) reproduite avec la permission].

Il est important de noter que les résultats obtenus avec ces souches de souris déplétées en mastocytes sont difficilement transposables à l'Homme puisqu'il n'existe pas de situation pathologique dans laquelle il y a un manque complet de ce type cellulaire (Ribatti, 2015). Un autre gros désavantage d'utiliser des souris déplétées en mastocytes, plus particulièrement les souches dont la déplétion mastocytaire est dépendante de l'expression du récepteur c-kit, est l'apparition d'anomalies congénitales que ces souris développent dû à leurs mutations génétiques qui affectent d'autres types cellulaires que les mastocytes (voir la revue de littérature (Yu, *et al.*, 2015) pour de plus amples détails concernant ces souches de souris). Dans le cas des études présentées dans cette thèse, la délétion du gène de la mMCP-4 (mMCP-4 KO) n'entraîne pas d'anomalie autre que la perte de l'activité de type chymotrypsine que l'on retrouve normalement dans les CTMC (Tchougounova, *et al.*, 2003). En plus des rôles dans la modification de la perméabilité de la BHE et dans l'influence des cytokines sécrétées dans la maturation et la différenciation des cellules T décrits précédemment, les mastocytes résidents au SNC ont été montrés dans l'EAE pour promouvoir l'infiltration des neutrophiles et ainsi contribuer à l'inflammation des méninges (Christy, *et al.*, 2013). Le Tableau 1 récapitule les différents rôles attribués aux mastocytes dans la SEP.

Tableau 1 : Rôles attribués aux mastocytes dans la SEP et dans le modèle animal EAE.

[Tableau 1 de (Elieh-Ali-Komi et Cao, 2017) reproduit avec la permission].

---

### Pathogenic roles of mast cells in EAE and MS

---

Migration and BBB permeability

Immune cell activation and differentiation

Promoting demyelination

Inflammation and immunoregulation

Cell death and apoptosis

---

#### 7.2.1.4.6 La chymase et l'endothéline-1

Les études de la professeure Brown ont démontré que les mastocytes avaient un rôle délétère dans l'EAE chez des souris dont la déplétion mastocytaire est dépendante de l'expression du récepteur c-kit (Secor, *et al.*, 2000; Gregory, *et al.*, 2005; Sayed, *et al.*, 2011; Christy, *et al.*, 2013; Russi, *et al.*, 2016). Il est cependant très difficile de procéder à l'élimination de tout un type cellulaire en clinique. On sait que certaines protéases mastocytaires comme la tryptase ont un impact sur la physiopathologie.

Parmi les nombreuses protéases mastocytaires connues, on retrouve la chymase. Celle-ci est synthétisée sous une forme inactive dans les mastocytes. Puis la chymase subit le clivage, facilité par la présence d'héparine permettant un repliement favorable de la protéine (Murakami, *et al.*, 1995), d'un dipeptide en position N-terminal par la dipeptidyl peptidase I (DPPI) pour la rendre active (Wolters, *et al.*, 2001) avant d'être emmagasiné dans les granules de sécrétion. La chymase est une hydrolase spécifique des liens peptidiques de type sérine protéase. Elle présente une activité enzymatique de type chymotrypsine, soit un clivage du côté carboxylique du lien peptidique suivant un acide aminé aromatique dont l'ordre préférentiel est la phénylalanine, la tyrosine puis le tryptophane (Hedstrom, 2002). Cette famille d'enzyme se distingue par la présence de trois acides aminés précis au niveau de son site actif formant ce que l'on appelle la triade catalytique (Carter et Wells, 1988). Brièvement le mécanisme enzymatique de la chymase se décrit en trois étapes principales : la formation du complexe enzyme-substrat, l'acylation et la déacylation. La formation du complexe enzyme-substrat se produit lorsque le résidu aromatique du substrat se positionne dans une orientation qui est favorable à la réaction dans la cavité hydrophobe de l'enzyme. Il s'ensuit une réaction d'acylation d'abord par l'attaque nucléophile de la sérine-195 de l'enzyme sur l'atome de carbone du carbonyle de la liaison peptidique du substrat formant un intermédiaire tétraédrique qui sera stabilisé par la formation d'un pont hydrogène dans la cavité oxy-anionique. Ceci produit une charge négative instable sur l'oxygène du carbonyle permettant une catalyse générale acide. En effet on observe alors que l'aspartate-102 du site actif polarise l'histidine-57 et permet un transfert de proton vers l'oxygène du carbonyle pour former un intermédiaire stable, l'acyl-enzyme. Puis en situation favorable, il se produit la déacylation, soit l'attaque du carbonyle de l'acyl-enzyme par une molécule d'eau aidée par



une catalyse basique de l'histidine-57 ce qui provoque la formation du produit de la réaction enzymatique et la régénération de l'enzyme à son état natif (Carter et Wells, 1988).

On connaît deux types de chymases : l' $\alpha$ -chymase et la  $\beta$ -chymase (Gallwitz et Hellman, 2006). Alors qu'on retrouve une seule  $\alpha$ -chymase chez l'Homme, on en retrouve plusieurs chez la souris nommées protéases des cellules mastocytaires (*murine mast cell protease* ; mMCP). Parmi celle-ci trois sont des  $\beta$ -chymases (mMCP-1, -2, -4) et une  $\alpha$ -chymase (mMCP-5). Les études précédentes ont permis de démontrer que la  $\beta$ -chymase mMCP-4 était celle ayant le plus d'homologie avec la chymase humaine (Tchougounova, *et al.*, 2003; Wu, *et al.*, 2005; Andersson, *et al.*, 2008). C'est donc pour cette raison que nous étudions cette isoforme murine en particulier au cours de la présente étude.

Des études récentes ont montré que l'endothéline-1 (ET-1) pouvait avoir un rôle délétère dans la SEP et l'EAE (Shin, *et al.*, 2001; D'Haeseleer, *et al.*, 2013; Hammond, *et al.*, 2015). L'ET-1 est, à ce jour, le plus puissant peptide vasoconstricteur rapporté dans la littérature découverte en 1988 par Masashi Yanagisawa (Yanagisawa, *et al.*, 1988). Elle est formée de 21 acides aminés et de deux ponts disulfures. Il existe trois isoformes d'endothélines soit l'ET-1, l'ET-2 et l'ET-3, dont les localisations cellulaires et les affinités pour les récepteurs varient (Inoue, *et al.*, 1989; Arinami, *et al.*, 1991; Masaki, 2000). L'ET active deux types de récepteurs couplés aux protéines G (*G protein-coupled receptors* : GPCR), soit ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> (Simonson et Dunn, 1990; Hosoda, *et al.*, 1991; Fan, *et al.*, 2000; Giannessi, *et al.*, 2001) que l'on retrouve sur de nombreux types cellulaires (Rubanyi et Polokoff, 1994). Une schématisation des voies de maturation de l'ET-1 se trouve à la Figure 8. L'ET-1 est très bien caractérisée pour son rôle dans le maintien de l'homéostasie de la pression artérielle étant donné son action vasoconstrictrice sur les cellules musculaires lisses vasculaires (MacCarthy, *et al.*, 2000; Giannessi, *et al.*, 2001; Attina, *et al.*, 2005; Murray, *et al.*, 2008). L'ET-1 a aussi été montrée dans certaines pathologies cardiovasculaires comme l'infarctus du myocarde et l'insuffisance pulmonaire primaire (Gray et Webb, 1996; Miyauchi et Masaki, 1999; Kobayashi, *et al.*, 2000; Attina, *et al.*, 2005; D'Orleans-Juste, *et al.*, 2008). Au niveau du SNC, l'ET-1 peut activer les astrocytes, agir comme neurotransmetteur directement sur les neurones, influencer la différenciation des OPCs, réguler la BHE et elle est impliquée dans la régulation autonome du système

cardiovasculaire (Sagher, *et al.*, 1994; Kuwaki, *et al.*, 1997; Kuwaki, *et al.*, 1999; Stokely, *et al.*, 2005; Bauer, *et al.*, 2007; Uesugi, *et al.*, 2009; Wang, *et al.*, 2010; Zampronio, *et al.*, 2010; Wang, *et al.*, 2011; Reijerkerk, *et al.*, 2012; Hammond, *et al.*, 2015). Ce dernier rôle sera discuté plus en détail un peu plus loin dans cette introduction.

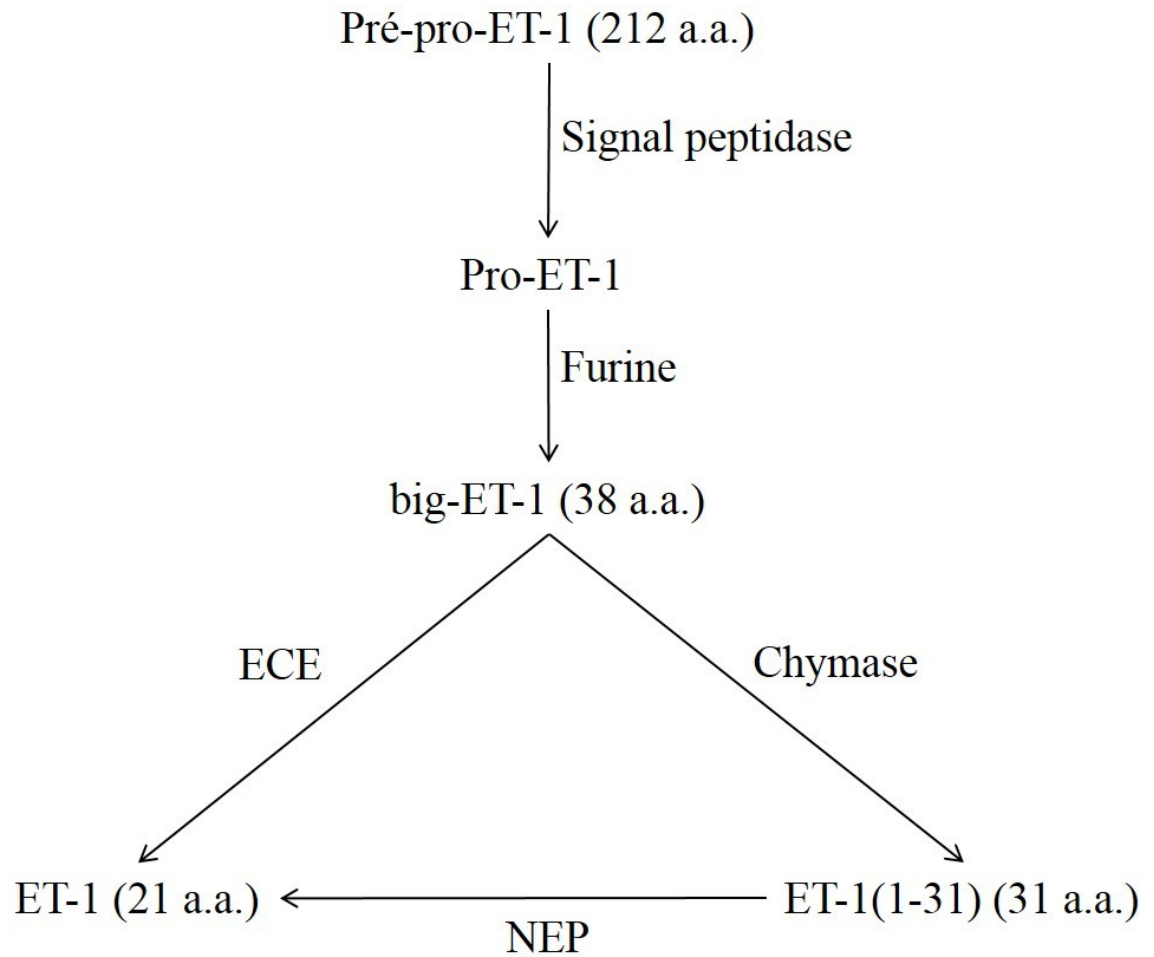


Figure 8 : Schématisation des voies de maturation de l'ET-1.

[Inspirée d'après la figure 1 de (D'Orleans-Juste, *et al.*, 2003)].

### 7.2.2 Traitements de la SEP

À ce jour, il y a 14 médicaments approuvés par Santé Canada pour le traitement de la SEP (SCSP, 2018c). Ce sont tous des immuno-modulateurs qui sont indiqués, selon leur mode d'action, pour les patients présentant la forme cyclique de la maladie. La plupart vont cibler différents mécanismes permettant le passage des lymphocytes T périphériques vers le SNC. Ils vont agir sur certains mécanismes régissant le processus inflammatoire pour diminuer la fréquence et la gravité des poussées, réduire le nombre de nouvelles lésions au cerveau et à la moelle épinière mises en évidence par l'IRM et ralentir l'accumulation des incapacités (O'Connor et Oh, 2014; SCSP, 2018d). Certaines molécules sont en études cliniques pour les formes cyclique et progressive de la maladie (O'Connor et Oh, 2014; SCSP, 2018e). Il y a de nouvelles cibles qui « apparaissent » dont la remyélinisation [anti-LINGO-1] (Plemel, *et al.*, 2017; SCSP, 2018f), le processus neuro-inflammatoire [minocycline] (SCSP, 2018h) et la restauration de la tolérance du soi par l'utilisation de traitements à base de cellules souches (SCSP, 2018g). Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) – présentes dans de nombreuses parties de l'organisme, notamment la moelle osseuse, la peau et la graisse – peuvent atténuer l'inflammation et réparer le tissu nerveux, ce qui en fait de bonnes candidates pour le traitement de la SEP (Ben-Hur, 2008; Caplan, 2009; Payne, *et al.*, 2011; Xiao, *et al.*, 2015; Cheng, *et al.*, 2017). Toutefois, il s'agit d'un traitement agressif qui est toujours en phase clinique.

Les traitements approuvés actuellement ont pour la plupart une efficacité modérée et ceux de deuxième ligne présentant des efficacités élevées vont généralement s'accompagner d'effets secondaires importants et graves (Naegle et Martin, 2014).

En dehors des traitements médicamenteux, d'autres formes de traitements prennent leur importance afin de permettre aux patients de conserver leur autonomie fonctionnelle le plus longtemps possible. On parle donc de réadaptation par kinésithérapie dès l'apparition d'un symptôme gênant la vie quotidienne (Kubsik-Gidlewska, *et al.*, 2017; Sanofi-Genzyme, 2018). De l'ergothérapie va être indiquée dès que les symptômes ont un retentissement sur les gestes quotidiens (Sanofi-Genzyme, 2018).

La dépression est plus répandue chez les personnes atteintes de SEP que dans la population en général (Patten, *et al.*, 2003; Jones, *et al.*, 2012; Wood, *et al.*, 2013; Toosy, *et al.*, 2014). Ce symptôme peut survenir en réaction au diagnostic, mais peut aussi apparaître à tout moment au cours de la maladie si la partie du cerveau gérant le centre de l'humeur est atteinte d'une plaque (Wilken et Sullivan, 2007). L'utilisation des traitements classiques de la dépression sera donc indiquée chez ces patients.

Bien qu'il n'y ait pas de données scientifiques sur les effets de la médecine alternative, certains patients vont voir des bienfaits par la pratique du yoga ou de la danse, de la méditation, de la massothérapie ou encore de l'acupuncture (Sanofi-Genzyme, 2018; SCSP, 2018i; WebMD, 2018).

### 7.2.3 Modèle animal : l'encéphalopathie auto-immune expérimentale

Dans le cadre des deux articles produits pour cette étude, nous avons utilisé un modèle de souris d'encéphalopathie auto-immune expérimentale (EAE). En effet les processus de développement et la progression pathologique de la SEP peuvent être « recréés » ou « mimés » chez les rongeurs comme la souris ou le rat. Ce modèle animal d'EAE se caractérise par une inflammation périvasculaire et une activation des cellules T CD4<sup>+</sup> et des cellules mononucléées qui mènent à une démyélinisation des axones du SNC provoquant une paralysie progressive ascendante. Une schématisation de l'échelle d'évaluation des incapacités neuromotrices utilisée dans le cadre des deux études présentées dans cette thèse, et dont plus de détails seront fournis dans la section méthodologie des articles, se retrouve à l'annexe 1. Il est possible d'obtenir ces différents modèles animaux selon une méthode d'induction active à l'aide d'une émulsion de la glycoprotéine oligodendrocytaire de la myéline (*myelin oligodendrocyte glycoprotein* : MOG<sub>35-55</sub>), de la protéine de base de la myéline (*myelin basic proteins* : MPB) ou de la protéine protéolipide (*proteolipid protein* : PLP) dans un adjuvant complet de Freund (CFA), selon une méthode de transfert passif ou grâce à des modèles spontanés par exemple avec les souris modifiées génétiquement 2D2<sup>+</sup> ou des modèles dépendants des cellules B (Miller, *et al.*, 2007; Kipp, *et al.*, 2012; Ben-Nun, *et al.*, 2014). Dans les modèles induits de façon active, on distingue deux phases soit, la phase d'induction et la phase effectrice. La première consiste à procéder à l'immunisation des

animaux afin de produire des cellules T CD4<sup>+</sup> spécifiques à la protéine de la myéline. La phase effectrice comprend la migration de ces cellules T vers le SNC, la production de chimiokines et de cytokines permettant l'afflux de phagocytes dans le SNC, l'activation des macrophages périphériques et résidents et la démyélinisation axonale (Miller, *et al.*, 2007).

Dans le cadre de la présente étude, l'immunisation à l'aide du MOG<sub>35-55</sub> a été préconisée étant donné la souche de souris utilisée, soit les C57Bl/6, qui sont résistantes à l'immunisation par *myelin basic protein* (MBP). L'immunisation directe donne généralement des symptômes cliniques moins sévères et moins rapides que par transfert passif. Il faut toutefois noter que l'EAE provoquée chez cette souche de souris via ce type d'immunisation provoque des signes cliniques s'apparentant à la forme PPMS qui n'est pas la plus répandue (environ 10% des patients), mais qui, jusqu'à présent, ne possède pas de traitement puisqu'elle ne présente pas de poussées qui sont suffisamment importantes pour que les traitements actuels soient efficaces.

### 7.3 Les cellules gliales

Comme indiqué précédemment, plusieurs types cellulaires ont été décrits dans la physiopathologie de la SEP. Dans les sections suivantes, j'aborderai plus en détails les astrocytes et les cellules microgliales dont on observe une activation chez les patients atteints de la SEP ainsi que dans les modèles animaux. L'activation de ces deux types cellulaires a été étudié afin d'évaluer l'implication de la mMCP-4 dans le développement pathologique chez la souris dans le cadre du premier article de cette thèse. De plus, j'introduirai les oligodendrocytes qui sont les cellules responsables de la production de la myéline au niveau du SNC qui est directement affectée dans la SEP. Nous nous sommes d'ailleurs également intéressés au niveau de myéline spinale que l'on retrouve dans notre modèle animal dans le but d'évaluer l'impact du KO de la mMCP-4 dans le développement de la pathologie chez nos souris.

### 7.3.1 Astrocytes

L'astrocyte est un constituant majeur du SNC. Les astrocytes sont caractérisés par une expression élevée de la protéine *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) (Eng, 1985; Eng, *et al.*, 2000) et cette expression augmente avec l'âge (Nichols, *et al.*, 1993). Nous pouvons d'ailleurs utiliser l'expression cette protéine afin d'évaluer le niveau d'astrogliose en situation pathologique comme par exemple en EAE.

#### 7.3.1.1 Les sous-types d'astrocytes

Il y a quatre classes d'astrocytes décrites chez l'Homme selon leur structure et leur anatomie : les astrocytes inter-laminaires, protoplasmiques, polarisés ou fibreux (Oberheim, *et al.*, 2006). Alors que chez les rongeurs, on retrouve seulement les astrocytes protoplasmiques ou fibreux décrits chez l'Homme. Les astrocytes protoplasmiques sont le type le plus abondant retrouvé dans le cerveau humain et murin. Ils sont caractérisés par la présence de pieds bulbeux périvasculaires, en fait tous les astrocytes protoplasmiques sont en contact avec les vaisseaux sanguins, et sont organisés en domaines. Ces astrocytes ont le potentiel de moduler la communication interneuronale et la possibilité d'intégrer localement des informations provenant d'un grand nombre de synapses (Kimelberg, 2007; Vasile, *et al.*, 2017). Les astrocytes fibreux sont quant à eux retrouvés plus profondément dans le cortex cérébral, au niveau de la matière blanche, ils sont caractérisés par une plus grande taille que les astrocytes protoplasmiques, mais possèdent moins de ramifications et celles-ci sont plus simples avec moins d'interconnexions (Miller et Raff, 1984; Oberheim, *et al.*, 2006).

#### 7.3.1.2 Les rôles physiologiques des astrocytes

Le premier rôle attribué à ces cellules était de procurer un support structurel au niveau du SNC en s'attachant aux neurones, aux terminaisons synaptiques et aux capillaires sanguins, offrant ainsi un soutien aux neurones et ancrant ces derniers aux capillaires qui sont leur source nutritive. Il est maintenant admis que le rôle de ce type cellulaire est nettement plus actif et complexe. Les astrocytes ont des propriétés électrophysiologiques, c'est-à-dire qu'ils participent au maintien de l'homéostasie ionique du SNC grâce à leurs canaux potassiques, calciques, sodiques et chloriques (Sontheimer, 1992). Les astrocytes

sont également impliqués dans la synaptogénèse lors du développement et dans la phase adulte lors de l'apprentissage ou suite à des changements environnementaux ou pathologiques par la relâche de facteurs synaptogéniques tels le TGF- $\beta$ , la synaptophysine, la *postsynaptic density protein 95* (PSD-95), l'hevin et la thrombospondine (Ullian, *et al.*, 2001; Kucukdereli, *et al.*, 2011; Diniz, *et al.*, 2012; Risher et Eroglu, 2012; Wang, *et al.*, 2012; Singh, *et al.*, 2016; Farhy-Tselnicker, *et al.*, 2017; Morel, *et al.*, 2017; Stogsdill, *et al.*, 2017; Boisvert, *et al.*, 2018). Ces cellules participent aussi à l'élimination des synapses soit par phagocytose grâce à l'expression de certains récepteurs, soit par l'induction de l'expression de composants de la cascade du complément (Stevens, *et al.*, 2007; Bialas et Stevens, 2013; Chung, *et al.*, 2013). Les astrocytes participent activement à la communication intercellulaire par la relâche, généralement dépendante du calcium, de gliotransmetteurs via des mécanismes de relâche vésiculaire (Bezzi, *et al.*, 2004; Zhang, *et al.*, 2004b; Pascual, *et al.*, 2005; Bowser et Khakh, 2007; Henneberger, *et al.*, 2010; Lalo, *et al.*, 2014) et des mécanismes de canaux et de transport actif (Lee, *et al.*, 2010; Woo, *et al.*, 2012). De plus, les astrocytes sont impliqués dans la capture et le recyclage des neurotransmetteurs qui se retrouvent dans l'espace extracellulaire, ainsi les astrocytes participent directement à la transmission synaptique et permettent un certain contrôle afin d'éviter l'excitotoxicité (Rothstein, *et al.*, 1996). Ce captage se produit grâce à des transporteurs glutamatergiques (Tong et Jahr, 1994; Huang, *et al.*, 2004; Murphy-Royal, *et al.*, 2015) et GABAergiques (Boddum, *et al.*, 2016; Boisvert, *et al.*, 2018). Suite au captage de ces neurotransmetteurs, ceux-ci sont recyclés et leur métabolisme permet de supporter la production énergétique essentielle aux neurones (Bouzier-Sore et Pellerin, 2013). Les astrocytes participent aussi activement à la signalisation calcique, importante dans la transmission synaptique, par la relâche spontanée de  $\text{Ca}^{2+}$ . Cette relâche peut également être stimulée par des neurotransmetteurs comme le glutamate et l'adénosine triphosphate (ATP), par l'innervation électrique (Khakh et McCarthy, 2015) ou par d'autres molécules neuro-actives comme l'adénosine diphosphate (ADP), l'histamine et l'acétylcholine (Perea et Araque, 2005; Fu, *et al.*, 2013).



### 7.3.1.3 L'organisation cellulaire : le syncytium et ses fonctions

Les astrocytes ont été montrés comme formant un syncytium fonctionnel. Les jonctions communicantes sont formées par l'expression de connexines (Cx30 et Cx43) qui forment des ponts perméables aux petites molécules hydrosolubles entre les cytoplasmes des cellules reliées ensemble. Ce réseau de communication permet de soutenir la transmission synaptique continue en contribuant à l'apport énergétique des neurones (Rouach, *et al.*, 2008), en accélérant la clairance du potassium dans l'espace extracellulaire (Wallraff, *et al.*, 2006) et en permettant des échanges d'ions, de métabolites et de neuro-modulateurs (Pannasch et Rouach, 2013). De plus, les astrocytes contribuent au métabolisme énergétique des neurones en absorbant, grâce à leurs pieds périvasculaires, le glucose sanguin puis suite à des processus métaboliques intracellulaires transmettent du lactate aux neurones (Hertz et Peng, 1992; Wiesinger, *et al.*, 1997; Brown, *et al.*, 2004; Pellerin, *et al.*, 2007; Machler, *et al.*, 2016). De plus, les liens entre les neurotransmetteurs captés par les astrocytes, les échanges ioniques, en particulier le potassium, et les pieds périvasculaires des astrocytes font en sorte que les astrocytes sont directement impliqués dans la régulation du flot sanguin cérébral par l'activation de la relâche de différents facteurs vasodilatateurs et vasoconstricteurs (Zonta, *et al.*, 2003; MacVicar et Newman, 2015). Finalement avec leurs pieds périvasculaires, les astrocytes font partie intégrante de la BHE et participent activement au maintien de cette importante structure vasculaire à travers différents facteurs solubles qui permettent plus particulièrement l'augmentation de l'expression des protéines formant les jonctions serrées (Igarashi, *et al.*, 1999; Alvarez, *et al.*, 2011; Mizze, *et al.*, 2014; Zhou, *et al.*, 2014; Gurnik, *et al.*, 2016; Liebner, *et al.*, 2018). La Figure 9 représente schématiquement quelques-uns des rôles décrits ci-dessus.

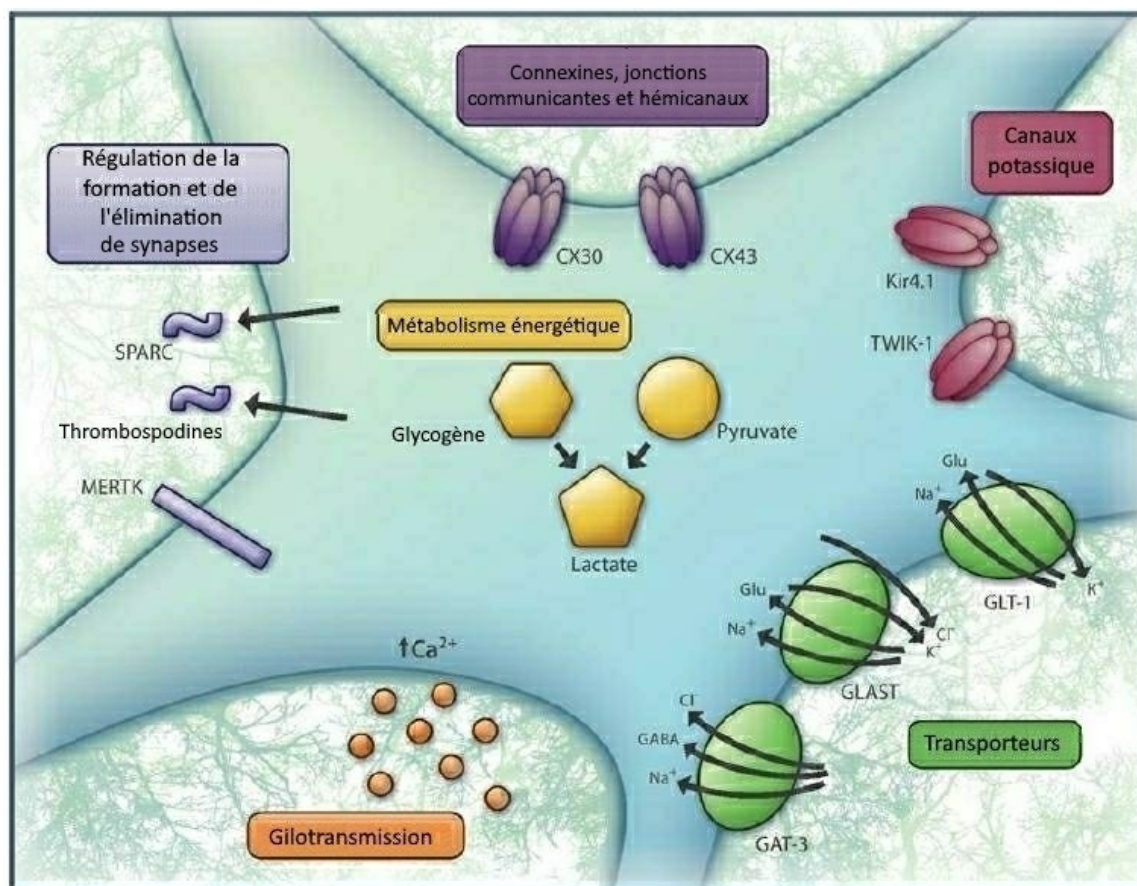


Figure 9 : Représentation schématique des rôles physiologiques des astrocytes.

Ceux-ci incluent les jonctions communicantes (Connexine, Cx30 et Cx43), les transporteurs (transporteur de glutamate, GLT-1; transporteur GABAergique de type 3, GAT-3; transporteur de glutamate et d'aspartate, GLAST) et canaux exprimés à la surface cellulaire (canaux potassiques Kir4.1 et TWIK-1), la régulation de la formation et de l'élimination des synapses (Thrombospondines; *myeloid-epithelial-reproductive tyrosine kinase*, MERTK; *Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine*, SPARC), le maintien du métabolisme énergétique (Glycogène, Lactate, Pyruvate) et la gliotransmission ( $Ca^{2+}$ ).

[traduction de la Figure 1 de (Xin et Bonci, 2018) provenant d'une source « *open access* » ne nécessitant pas de permission particulière pour la reproduction].

### 7.3.2 Cellules microgliales

Les cellules microgliales sont des cellules résidentes du SNC, qui tirent leur origine du mésoderme, décrite en 1919 par Pío del Río-Hortega (Kierdorf et Prinz, 2017). Morphologiquement, ces cellules sont décrites comme de petites cellules de forme ovoïde ayant un petit corps cellulaire contenant peu d'organelles, mais dotées de longs prolongements avec des processus secondaires et des lamellipodes (Perry et Gordon, 1988). Le corps cellulaire est immobile, mais les prolongements et les lamellipodes sont constamment en mouvement afin de jouer leur rôle d'immunosurveillance du SNC environnant et agir en faisant de la phagocytose et de la pinocytose (Booth et Thomas, 1991; Stence, *et al.*, 2001; Nimmerjahn, *et al.*, 2005).

Au cours du développement embryonnaire, les cellules microgliales font leur apparition très tôt à partir d'une seule vague de cellules progénitrices (Ginhoux, *et al.*, 2013). En phase « adulte », elles sont distribuées dans la totalité du parenchyme et sont retrouvées dans toutes les régions du SNC, bien que leur densité varie d'une région à l'autre et qu'elles semblent plus abondantes dans la substance grise par rapport à la substance blanche (Perry, *et al.*, 1985; Lawson, *et al.*, 1990). Il est possible de mesurer les cellules microgliales réactives par l'augmentation de l'expression de la molécule *ionized calcium binding adaptor molecule 1* (Iba1), qui sert de marqueur spécifique de la microglie (Ohsawa, *et al.*, 2004).

#### 7.3.2.1 Rôles physiologiques des cellules microgliales

Les cellules microgliales présentent quatre rôles principaux durant le développement et durant la phase adulte du SNC dont la Figure 10 représente un résumé.

D'abord ces cellules sont reconnues comme des professionnelles de la phagocytose. Au cours du développement, elles s'emploient à éliminer les neurones apoptotiques (Ashwell, 1990; Brockhaus, *et al.*, 1996; Witting, *et al.*, 2000) et ce sans induire le processus inflammatoire (Takahashi, *et al.*, 2005). Il a été également montré que la microglie pouvait fournir un support trophique au SNC en développement par la sécrétion de facteurs neurotrophiques variés comme le *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), le *basic fibroblast growth factor* (FGF-2) ou le *plasminogen* (PGn) par exemple (Morrison, *et al.*,

1986; Shimojo, *et al.*, 1991; Nagata, *et al.*, 1993a; Nagata, *et al.*, 1993b; Elkabes, *et al.*, 1996; Hamanoue, *et al.*, 1996; Batchelor, *et al.*, 1999; Nakajima, *et al.*, 2001). Un autre processus important durant le développement embryonnaire dans lequel les cellules microgliales ont démontré un rôle est l'angiogenèse au niveau du SNC. En effet, les vaisseaux sanguins sont vitaux puisqu'ils permettent l'apport en oxygène et aux nutriments à tous les systèmes. Les cellules microgliales guident donc le bourgeonnement des vaisseaux sanguins par la relâche de facteurs pro-angiogéniques dans un processus de communication bidirectionnelle entre le vaisseau sanguin et la microglie (Checchin, *et al.*, 2006; Rymo, *et al.*, 2011; Arnold et Betsholtz, 2013). Le dernier rôle attribué à ces cellules dans la phase développementale du SNC est la modulation de l'activité neuronale au niveau synaptique grâce à leur contact direct qu'elles maintiennent avec les neurones et les astrocytes, mais également par leur propriété de phagocyte en éliminant les éléments présents dans les synapses ou en phagocytant les dendrites inutilisées (Stevens, *et al.*, 2007; Wake, *et al.*, 2009; Tremblay, *et al.*, 2010; Paolicelli, *et al.*, 2011; Li, *et al.*, 2012b; Schafer, *et al.*, 2012).

Dans la phase dite « adulte », quatre rôles ont été décrits pour la microglie : la surveillance immunitaire du SNC, la modulation de la plasticité synaptique, la régulation de la neurogenèse et l'interaction avec la périphérie. Comme les cellules du système immunitaire périphérique n'ont pas accès au SNC à cause de la BHE, ce sont les cellules microgliales qui font office de système immunitaire (Aloisi, 2001). Les rôles de ces cellules dans la plasticité synaptique et la neurogénèse en conditions normales ressemblent beaucoup à ceux qu'elles tiennent en phase développementale, soit la relâche de facteurs neurotrophiques, les interactions directes avec les neurones et ses propriétés phagocytes (Sierra, *et al.*, 2010; Bachstetter, *et al.*, 2011; Tremblay, *et al.*, 2011; Parkhurst, *et al.*, 2013; Sellner, *et al.*, 2016). Finalement, la microglie est également en contact direct et indirect avec les cellules périphériques comme les macrophages périvasculaires et les cellules endothéliales et avec le sang. Ce contact rend les cellules microgliales sensibles aux changements métaboliques se produisant dans le système périphérique (Baufeld, *et al.*, 2016). De plus, une étude récente a montré une dépendance au microbiote intestinal pour le fonctionnement de la microglie mature (Erny, *et al.*, 2015), suggérant donc que ce qui se produit en périphérie a un impact direct sur l'homéostasie du SNC.

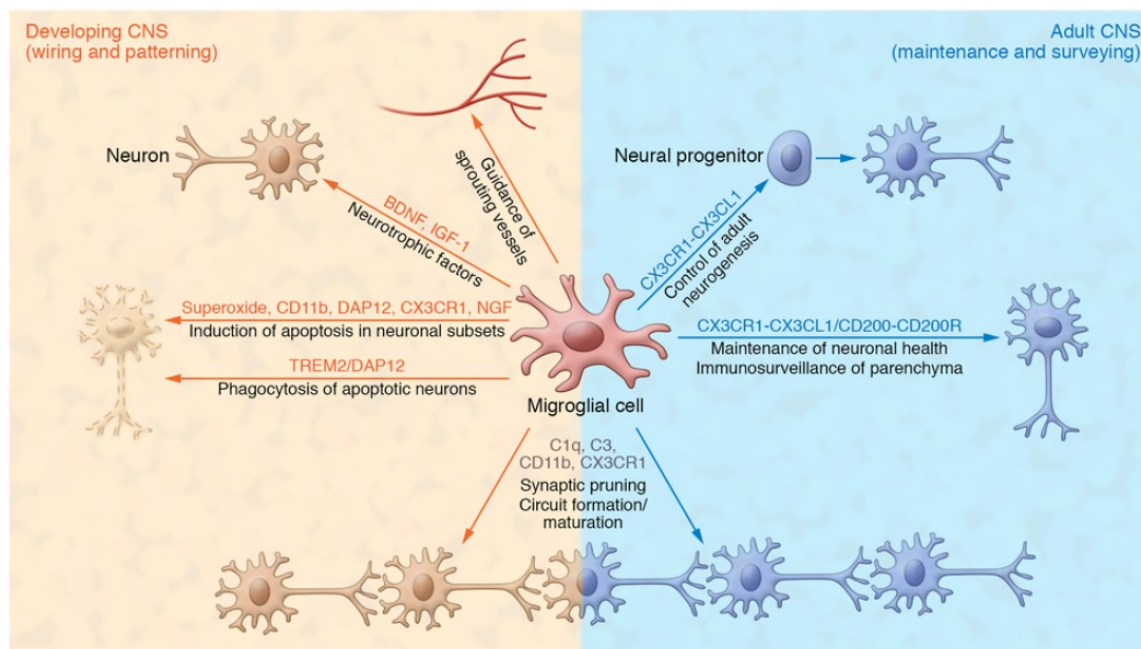


Figure 10 : Rôles physiologiques décrits pour les cellules microgliales en phase développementale du SNC et en phase « adulte ».

[Figure 1 de (Kierdorf et Prinz, 2017) reproduite avec la permission].

### 7.3.3 Oligodendrocytes

Les oligodendrocytes sont le troisième type de cellules gliales décrites dans le SNC. Ces cellules présentent un petit corps cellulaire dont le noyau contient une grande quantité de chromatine et les prolongements cytoplasmiques contiennent des granules, mais pas de fibres. Pío del Río-Hortega en a décrit quatre types : le premier génère plusieurs segments de myéline de petits diamètres dans diverses directions, le second ressemble au premier, mais produit des segments de myélines parallèles les uns aux autres, le troisième type entoure plusieurs axones de grands diamètres et le quatrième type a le corps cellulaire très près d'un seul très gros axone (Simons et Nave, 2016). Il s'agit du dernier type cellulaire à se former durant le développement du SNC. Sous forme mature, les oligodendrocytes sont fibreux et fragiles. Ils ne prolifèrent pas ni ne migrent. Toutefois les OPCs, dont sont issus les oligodendrocytes matures, sont hautement migratrices et prolifératives même chez les sujets adultes (Calver, *et al.*, 1998; Young, *et al.*, 2013; Goldman et Kuypers, 2015).

#### 7.3.3.1 La genèse des oligodendrocytes

Dans le cerveau, de même que dans la moelle épinière, la genèse des oligodendrocytes se produit en trois vagues dont la première est enclenchée par le signal *Sonic hedgehog* (SHH) (Orentas, *et al.*, 1999; Nery, *et al.*, 2001) puis une migration tangentielle et dorsale se produit jusqu'à une colonisation de la totalité du cerveau antérieur. Une seconde vague débute quelques jours plus tard dans le cerveau antérieur médial et migre dorsalement jusqu'au cortex. Finalement une troisième vague se produit un peu avant la naissance, de là débute une projection radiale à partir de la zone sous-ventriculaire (*subventricular zone* : SVZ) puis peuple le corps calleux et se mélange aux OPCs provenant des éminences ganglionnaires (Kessaris, *et al.*, 2006). Il existe une haute redondance pour les précurseurs ventraux et dorsaux menant à un niveau normal d'oligodendrocytes et de myéline une fois à maturité (Kessaris, *et al.*, 2006; Richardson, *et al.*, 2006). De plus les propriétés électrophysiologiques des OPCs de provenance ventrale ou dorsale sont similaires (Tripathi, *et al.*, 2011).

Les mécanismes de régulation du développement des oligodendrocytes depuis les régions germinales du développement du SNC, à la maturation, à la migration puis à la différenciation des OPCs en oligodendrocytes matures jusqu'à la production de myéline par ces derniers sont hautement régulés à plusieurs niveaux. Cette régulation fait appel à de nombreuses voies de signalisation promotrices et inhibitrices dont de nombreux détails ont été décrits par (Mitew, *et al.*, 2014).

#### 7.3.3.2 La migration des cellules progénitrices des oligodendrocytes OPCs

Suite à leur migration, la population d'OPCs est distribuée de façon relativement uniforme dans le SNC adulte, cette distribution peut être attribuée au processus dynamique de la migration qui s'effectue de façon à repousser les autres OPCs (Hughes, *et al.*, 2013). Cette migration est influencée, selon l'étape de développement, par l'expression des récepteurs de surface sur les OPCs et par leur emplacement dans le SNC, par de nombreux facteurs, soit des facteurs mitogéniques comme le *platelet growth factor AA* (PDGF-AA) (Miyamoto, *et al.*, 2008) et le FGF-2 (Osterhout, *et al.*, 1997), soit des facteurs d'adhésion et des molécules de contact présents dans la matrice extracellulaire (Garcion, *et al.*, 2001; Bribian, *et al.*, 2008; Mitew, *et al.*, 2014) ou sur d'autres types cellulaires (Milner, *et al.*, 1996; Decker, *et al.*, 2000; Schnadelbach, *et al.*, 2000; Tiwari-Woodruff, *et al.*, 2001; Prestoz, *et al.*, 2004; Zhang, *et al.*, 2004a; Biname, *et al.*, 2013; Mitew, *et al.*, 2014) de même que directement sur les OPCs en migration (Kirby, *et al.*, 2006; Hughes, *et al.*, 2013), soit par des molécules chimio-attractantes comme le PDGF-AA (Zhang, *et al.*, 2004a), le FGF-2 (Bribian, *et al.*, 2006), la signalisation SHH (Merchan, *et al.*, 2007), le *C-X-C motif chemokine ligand* (CXCL)12 (Dziembowska, *et al.*, 2005), le CXCL1 (Tsai, *et al.*, 2002) et les facteurs de la famille des semaphorines (Spassky, *et al.*, 2002; Taniguchi, *et al.*, 2009; Armendariz, *et al.*, 2012). Tous ces processus et le message d'initiation de la différenciation sont possibles puisque les OPCs échantillonnent constamment leur environnement grâce à leurs prolongements mobiles et présentent un large éventail de récepteurs sensibles aux signaux perçus dans leur environnement (Kirby, *et al.*, 2006; Hughes, *et al.*, 2013).

### 7.3.3.3 La maturation des OPCs en oligodendrocytes myélinisants

Lorsque les précurseurs sont bien en place ceux-ci doivent sortir du cycle cellulaire (Casaccia-Bonnet, *et al.*, 1999; Larocque, *et al.*, 2005; Chew, *et al.*, 2011) pour devenir des oligodendrocytes post-mitotiques dans lesquels la condensation de la chromatine permet d'éteindre les signaux prolifératifs comme Wnt, FGF et PDGF (Casaccia-Bonnet, *et al.*, 1999; Larocque, *et al.*, 2005; Chew, *et al.*, 2011). Finalement, ces oligodendrocytes recevront une activation transcriptionnelle par le *myelin regulatory factor* (MYRF) menant à des oligodendrocytes matures exprimant différentes protéines essentielles à la formation de myéline (Emery, *et al.*, 2009; Goldman et Kuypers, 2015).

### 7.3.3.4 Le rôle de support trophique des oligodendrocytes aux neurones

Au-delà de la simple production de myéline, les oligodendrocytes sont maintenant reconnus pour avoir un rôle important dans le support métabolique des neurones qu'ils enveloppent. En effet, les neurones sont de grands consommateurs d'énergie et n'ayant pas suffisamment d'énergie emmagasinée pour combler ces besoins, ils doivent être épaulés par les cellules gliales présentes au SNC. Les oligodendrocytes matures en phase de myélinisation ont des besoins énergétiques élevés qu'ils comblent en important du glucose et du lactate (Rinholm, *et al.*, 2011) pour permettre la synthèse d'une grande quantité de lipides et donc permettre la production de myéline. Toutefois, lorsque la production de myéline est complétée, les besoins énergétiques des oligodendrocytes diminuent et ceux-ci peuvent survivre avec seulement la glycolyse. Des études ont montré que le surplus de molécules énergétiques que les oligodendrocytes produisent et captent est alors dérivé vers les axones myélinisés sous forme de lactate que les neurones peuvent utiliser dans la respiration mitochondriale pour produire une grande quantité d'ATP (Funfschilling, *et al.*, 2012). Les mécanismes de transport du glucose provenant de la circulation sanguine par les oligodendrocytes se produisent via le transporteur de glucose 1 (GLUT1) présent à la membrane plasmique du corps cellulaire des oligodendrocytes (Yu et Ding, 1998). Ce glucose est métabolisé au niveau intracellulaire et est relâché sous forme de lactate et de pyruvate, la source d'énergie préférentielle des neurones (Wyss, *et al.*, 2011), dans l'espace péri-axonal par le *monocarboxylate transporter 1* (MCT1) (Rinholm, *et al.*, 2011; Lee, *et al.*,



2012b) d'où les neurones peuvent le capter par le transporteur MCT2 et l'utiliser pour combler leurs besoins métaboliques (Funfschilling, *et al.*, 2012; Lee, *et al.*, 2012b). L'activité du transporteur GLUT1 peut être augmentée par le récepteur acide N-méthyl-D-aspartique (NMDA) présent à la surface membranaire des oligodendrocytes pour répondre à une augmentation de l'activité neuronale qui enclenche une élévation de l'influx calcique et une relâche de glutamate (Saab, *et al.*, 2016). De plus, les astrocytes contribuent également à l'apport énergétique des oligodendrocytes, et subséquemment au support que ces derniers offrent aux neurones, via le réseau de jonctions communicantes formé par l'expression de connexines Cx32 et Cx47 à la surface des oligodendrocytes et des Cx43 et Cx30 à la surface des astrocytes (Magnotti, *et al.*, 2011; Niu, *et al.*, 2016). La Figure 11 présente un schéma récapitulatif des voies impliquées dans le support métabolique offert aux neurones par leurs oligodendrocytes myélinisants.

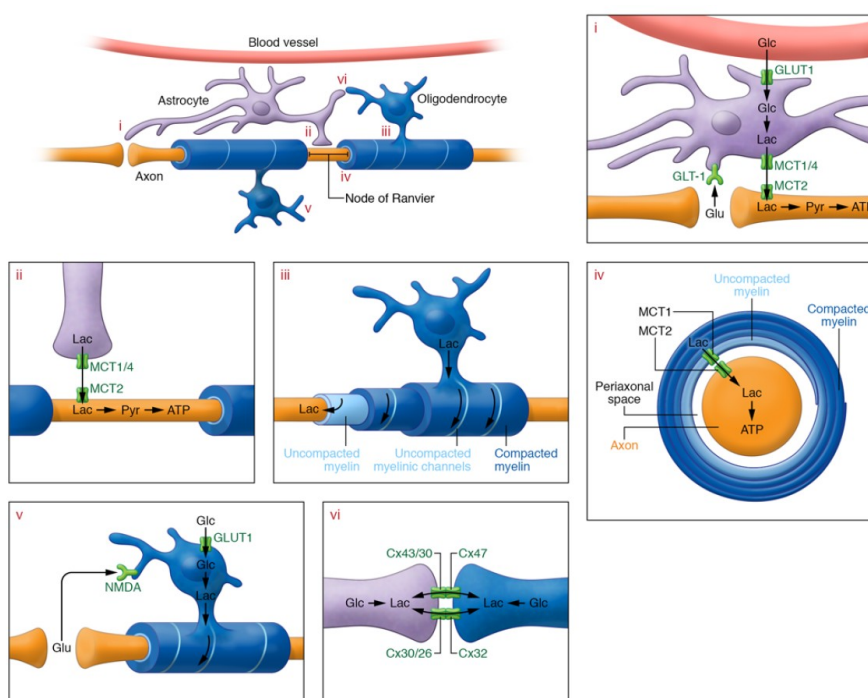


Figure 11 : Schéma récapitulatif de l'implication des oligodendrocytes dans le support métabolique offert aux neurones.

[Figure 3 de (Philips et Rothstein, 2017) reproduite avec la permission].

(i) Au niveau synaptique, l'activité neuronale permet la relâche de Glu dans l'espace extracellulaire qui est recapté via le transporteur GLT-1 par les astrocytes. De plus, le recaptage de Glu active le captage de Glc par les astrocytes via le transporteur GLUT1 qui est alors converti en Pyr et en Lac. Le Lac peut être envoyé vers les neurones à travers les transporteurs MCT1/MCT4 et MCT2. Cet apport de Lac permet aux mitochondries des neurones de produire de l'ATP. (ii) Les astrocytes en contact au niveau du nœud de Ranvier des neurones peuvent transmettre des substrats métaboliques à travers les transporteurs MCT/MCT4 et MCT2 qui peuvent ensuite être utilisés par les mitochondries neuronales pour produire de l'énergie. (iii) La myéline provenant des oligodendrocytes comprend des régions compactées et d'autres non compactées. Les régions non compactées permettent le transport de métabolites vers les régions situées près de l'axone où ils peuvent alors être transportés vers les neurones. (iv) Ce transport se produit à travers les transporteurs MCT1 et MCT2, les neurones peuvent ensuite utiliser ces métabolites pour la synthèse d'ATP. (v) Les fonctions de support métabolique par les oligodendrocytes est régulée par la liaison du Glu aux récepteurs NMDA. Cette liaison est suivie par une augmentation du captage du Glc par les oligodendrocytes et une conversion de celui-ci en Lac pouvant être transféré aux neurones. (vi) Les oligodendrocytes utilisent également les jonctions communicantes avec les astrocytes pour se procurer du lactate. (Les abréviations pour cette figure : Glc, glucose; GLUT1, transporteur de glucose 1; Lac, lactate; GLT-1, transporteur de glutamate; MCT, transporteur de monocarboxylate; Pyr, pyruvate; Glu, glutamate; ATP, adénosine triphosphate; NMDA, récepteur acide N-méthyl-D-aspartique; Cx, connexine.

### 7.3.3.5 Myéline

L'enveloppe de myéline peut être vue comme une membrane constituée d'un empilement de plusieurs couches de même épaisseur produisant une gaine protectrice autour des axones d'une certaine taille. Sur un axone myélinisé, on retrouve une alternance de zones entourées de myéline et d'autres exemptes. Ces sections exemptes de myéline s'appellent Nœuds de Ranvier. C'est ainsi que peut se produire la conduction saltatoire, qui permet d'accélérer la vitesse de propagation de l'influx nerveux tout en permettant de faire des économies d'énergie pour les neurones et faciliter le transport en lactate depuis les oligodendrocytes tels que décrits précédemment.

La gaine de myéline est formée, au niveau du SNC, par les oligodendrocytes myélinisants différenciés. Le processus de myélinisation s'effectue en plusieurs étapes dont les premières consistent à la prolifération et à la migration des OPCs puis à la différenciation de celles-ci suite à la reconnaissance de signaux présents dans l'environnement telle que décrite dans la section précédente. Lorsque les oligodendrocytes sont matures, ils peuvent commencer les étapes subséquentes qui seront discutées ci-dessous, soit l'excroissance de la membrane pour l'enveloppement axonal, la circulation des composants membranaires nécessaires à l'enroulement, la compaction de la myéline puis la formation des nœuds (Simons et Nave, 2016).

Lorsqu'un oligodendrocyte détecte un axone de taille suffisamment importante pour initier la myélinisation (Lee, *et al.*, 2012a) il se produit de grands changements dans l'architecture membranaire. De plus certains signaux inhibiteurs ont été décrits afin de sélectionner les « bons » axones à myéliniser et aussi afin de myéliniser seulement les axones et non pas les autres composants cellulaires comme les dendrites ou les autres composants du SNC (Charles, *et al.*, 2000; Piaton, *et al.*, 2011; Syed, *et al.*, 2011; Sharma, *et al.*, 2015; Redmond, *et al.*, 2016). La myéline s'étend alors comme une hélice tournant autour de l'axone sous forme d'une spirale ou d'un croissant (Pedraza, *et al.*, 2009; Sobottka, *et al.*, 2011) en suivant deux mouvements distincts : la « langue » intérieure qui initie l'enroulement autour de l'axone sous la membrane précédemment déposée et l'extension latérale des membranes de myéline vers les régions nodales (Simons et Nave, 2016). Le

déplacement de la « langue » intérieure est poussé par la force de polymérisation et de désassemblage de filaments d'actine en combinaison avec la protéine MBP sous le contrôle de certains régulateurs comme ADF/cofilin1 afin de permettre la croissance du feuillet de myéline (Nawaz, *et al.*, 2015; Zuchero, *et al.*, 2015). Les bords latéraux, riches en cytoplasme, de chaque couche de myéline demeurent en contact avec l'axone et se déplacent à la manière d'une hélice vers le futur nœud où ils finissent par s'aligner et former la boucle para-nodale où il y a possiblement une stabilisation par l'ankyrin-G (Chang, *et al.*, 2014). La membrane de l'oligodendrocyte se retrouve attachée à l'axone durant cette phase d'extension latérale (Zonta, *et al.*, 2008; Pedraza, *et al.*, 2009).

On retrouve, au sein de la myéline en formation, des canaux cytoplasmiques dans les sections compactées de la myéline qui permettent le transport du matériel nécessaire à la zone en croissance. Les différentes composantes de la myéline sont synthétisées dans plusieurs localisations subcellulaires de l'oligodendrocyte pour être ensuite transportées vers le feuillet de myéline en formation. Ces composantes comprennent de nombreux lipides, dont plusieurs sont préassemblés avec des PLP (Simons, *et al.*, 2000; Baron, *et al.*, 2015) et le MBP (Wake, *et al.*, 2011). D'abord les lipides et les protéines atteignent la membrane extérieure de la myéline puis diffusent latéralement. La protéine MBP est nécessaire à la compaction de la myéline. Cette protéine est produite grâce au transport de son ARN messenger (ARNm) dans des granules cytoplasmiques et le processus de compaction s'effectue par la progression de la MBP de l'extérieur, c'est-à-dire près de l'axone, vers l'intérieur du feuillet (Colman, *et al.*, 1982; Ainger, *et al.*, 1993; Laursen, *et al.*, 2011; Snaidero, *et al.*, 2014). Comme le processus de production de la MBP s'effectue à une certaine distance du lieu de compaction, la protéine 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNP1) permet de réguler la vitesse de compaction (Gravel, *et al.*, 1996; Snaidero, *et al.*, 2014). Lorsqu'une protéine MBP se lie à deux feuillets cytoplasmiques adjacents, celle-ci interagit avec les protéines MBP déjà déposées, comme une polymérisation par des interactions latérales, entraînant un glissement de la membrane sur les surfaces cytoplasmiques de la bicouche de myéline (Aggarwal, *et al.*, 2013). La liaison de la MBP à la membrane entraîne la neutralisation des charges et des changements conformationnels majeurs de la protéine (Harausz, *et al.*, 2009; Aggarwal, *et al.*, 2013; Bakhti,

*et al.*, 2014). Cette formation de polymères de MBP mène à une déplétion des protéines associées à la membrane et produit une barrière permettant de limiter l'entrée de nouvelles protéines ayant un grand domaine cytoplasmique (Aggarwal, *et al.*, 2011). Ainsi la partie compactée de la myéline s'appauvrit en glycoprotéines membranaires ce qui facilite l'association des surfaces extracellulaires des bicouches (Bakhti, *et al.*, 2014). Finalement la couche de myéline compactée nouvellement formée est stabilisée par un échafaudage de filaments de septine sous la couche de membrane interne (Patzig, *et al.*, 2016).

#### 7.4 Le système nerveux autonome

Dans le cadre du deuxième article de cette thèse, nous nous sommes intéressés aux paramètres hémodynamiques des souris conscientes et des réponses cardiovasculaires de celles-ci suite à des administrations intraveineuses et intrathécales d'ET-1 ou de son précurseur, la big-ET-1. J'introduirai donc le système nerveux autonome puisque celui-ci est directement impliqué dans le maintien des fonctions cardiaques et dans les réponses pressives induites par l'administration centrale des endothélines. De plus, le SNA est également impliqué dans les fonctions digestives et sexuelles. Toutes ces fonctions peuvent être affectées par la neurodégénérescence chez les patients atteints de SEP (McDougall et McLeod, 2003; Kale, *et al.*, 2009).

##### 7.4.1 « Anatomie » des systèmes sympathique et parasympathique (Marieb, 2005)

Le système nerveux autonome (SNA) est responsable de l'innervation des muscles lisses, des muscles cardiaques et des glandes endocrines et exocrines, via l'action de neurones moteurs, dans le but d'assurer le bon fonctionnement de l'organisme. Ce système est sensible à plusieurs stimuli provenant de l'environnement et du milieu interne afin de réguler l'activité cardiaque, la pression artérielle, la température corporelle, la fonction digestive, la respiration et les fonctions sexuelles. La plupart des voies régulées par ce système n'atteignent pas le seuil de la conscience, bien que les centres nerveux supérieurs, c'est-à-dire la moelle épinière, le tronc cérébral, l'hypothalamus et le cortex cérébral via le système limbique, soient impliqués dans le contrôle du SNA (Marieb, 2005; Karemaker, 2017). Plus

particulièrement pour le système cardiovasculaire, le contrôle réflexe de la fréquence cardiaque, du diamètre des vaisseaux sanguins et la respiration s'effectue grâce à la formation réticulaire du tronc cérébral et plus précisément au niveau de la *médulla oblongata*. Toutefois l'hypothalamus est le ganglion principal du contrôle du SNA, dont certains noyaux permettent de coordonner, entre autres, l'activité cardiaque et la pression artérielle par des fonctions parasympathiques et sympathiques.

#### 7.4.1.1 Anatomie et morphologie du SNA

Le SNA se distingue du SNC par son anatomie : les fibres nerveuses motrices qui le composent n'ont pas les mêmes effecteurs, efférences et neurotransmetteurs que les fibres du système somatique (Marieb, 2005; Brodal, 2010). Comme mentionné ci-dessus, le SNA innervé les muscles cardiaques, les muscles lisses ainsi que les glandes endocrines et exocrines. Les voies efférentes se distinguent également. En effet le SNA comprend des chaînes de deux neurones, soit un neurone pré-ganglionnaire, dont les axones sont minces et myélinisés, et un neurone post-ganglionnaire, dont l'axone est amyélinisé, qui projette à l'organe qu'il innervé (Wehrwein, *et al.*, 2016). On retrouve le noyau du premier au niveau central alors que le deuxième se retrouve dans les ganglions à l'extérieur du SNC. Étant donné que ces neurones sont très rarement myélinisés, la vitesse de propagation des influx nerveux est nettement plus lente que dans le système somatique, en plus d'avoir une fréquence d'influx nerveux moins importante. Les fibres formant le système parasympathique émergent des nerfs craniens n° III, VII, IX et X et des segments sacrés (S2, S3 et S4) de la moelle épinière, d'où l'appellation système cranosacré, alors que les fibres formant le système sympathique émergent des régions thoracique et lombaire de la moelle épinière, d'où l'appellation système thoraco-lombaire (Marieb, 2005). Une autre particularité anatomique de ces deux systèmes est la longueur des fibres neuronales ainsi que la situation des ganglions qui les composent. En effet, le système sympathique se caractérise par de courtes fibres pré-ganglionnaires et de longues fibres post-ganglionnaires. Les ganglions sont situés près de la moelle épinière et sont organisés sous forme de chaînes para-vertébrales de part et d'autre de la colonne vertébrale et qui ressemblent à un chapelet de billes luisantes. De plus, les signaux des fibres pré-ganglionnaires peuvent remonter ou descendre le long de la chaîne para-vertébrale avant de faire synapse au niveau des fibres post-ganglionnaires. On

retrouve également dans le système nerveux sympathique des ganglions prévertébraux, intermédiaires et terminaux, c'est-à-dire des ganglions situés entre les ganglions para-vertébraux et l'organe cible. Ce faisant la réponse attribuable à l'activation de la voie sympathique peut être diffusée dans plusieurs régions. Quant au système parasympathique, on observe le contraire, c'est-à-dire de longues fibres pré-ganglionnaires et de très courtes fibres post-ganglionnaires se rendant près ou même à l'intérieur des organes cibles. Les ganglions du système parasympathique se trouvent très près ou directement dans les organes que le système innerve. Cette anatomie fait que l'activation de la voie parasympathique provoque des réponses très localisées (Thomas, 2011; Rang, *et al.*, 2016b; Wehrwein, *et al.*, 2016; Westfall, *et al.*, 2017; Katzung, 2018).

#### 7.4.1.2 Pharmacologie du SNA

L'autre différence importante qui distingue le SNA est les neurotransmetteurs post-ganglionnaires libérés qui peuvent faire office d'excitateur ou d'inhibiteur selon le type de récepteurs présent au niveau de la cible. De façon générale, ces neurotransmetteurs vont agir soit en modifiant la perméabilité cellulaire aux ions, soit en activant ou en inhibant une enzyme au niveau intracellulaire (Marieb, 2005). Au niveau du SNA sympathique, la noradrénaline est le neurotransmetteur libéré, alors que les neurones du SNA parasympathique libèrent de l'acétylcholine (voir la Figure 12 pour un schéma récapitulatif) (Ernsberger, 2001; Marieb, 2005; Brodal, 2010; Wehrwein, *et al.*, 2016; Karemaker, 2017; Katzung, 2018). Évidemment il s'agit ici d'une simplification schématique de la description des neurotransmetteurs du SNA, il existe des co-neurotransmetteurs et co-médiateurs peptidiques très importants, mais dont il ne sera pas question dans cette thèse. Les deux types de récepteurs de l'acétylcholine sont les récepteurs nicotiniques, des récepteurs de type ionique, qui ont pour effet de stimuler la cible, et les récepteurs muscariniques, des récepteurs métabotropes c'est-à-dire associés à l'activité d'une GPCR, dont les effets peuvent être stimulants ou inhibiteurs dépendamment de l'organe cible (Rang, *et al.*, 2016a; Wehrwein, *et al.*, 2016; Brown, *et al.*, 2017; Hibbs et Zambon, 2017; Katzung, 2018). Les deux types de récepteurs à la noradrénaline sont les récepteurs  $\alpha$ -adrénergiques et les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques dont les effets peuvent être excitateurs ou inhibiteurs dépendamment du sous-type de récepteur ainsi que de leur localisation tissulaire. La distribution des récepteurs

adrénergiques varie d'un organe à l'autre, certains expriment uniquement l'un ou l'autre ou les deux types à la fois (Marieb, 2005; Rang, *et al.*, 2016c; Wehrwein, *et al.*, 2016; Katzung, 2018).



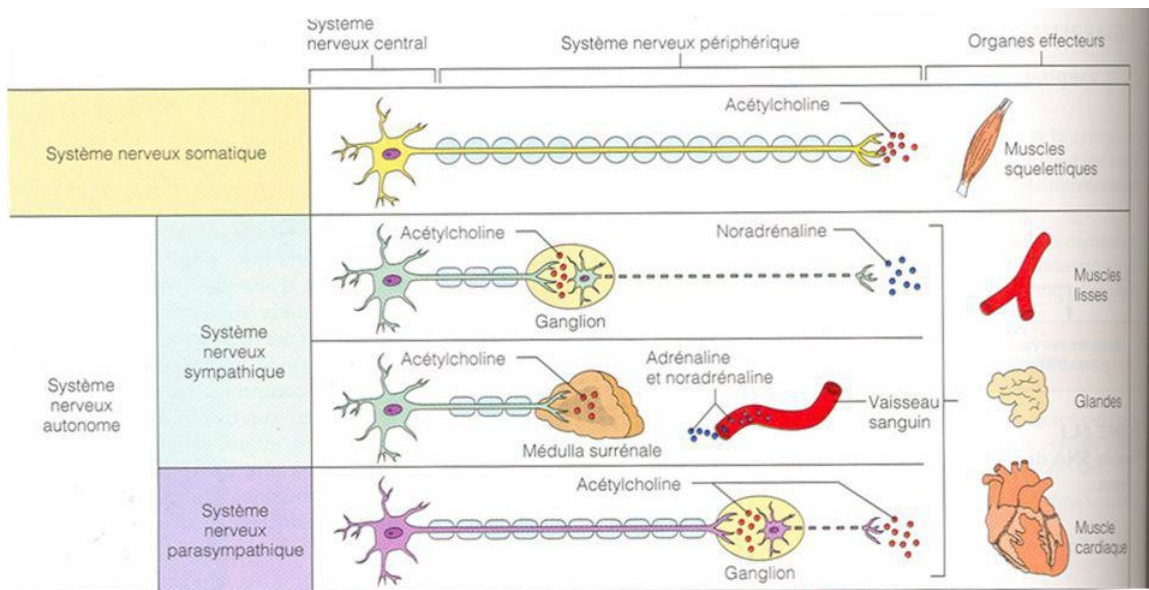


Figure 12 : Comparaison entre le système nerveux somatique et le système nerveux autonome.

[Figure 14.2 de (Marieb, 2005) reproduite avec la permission].

#### 7.4.1.3 Rôles physiologiques au niveau du système cardiovasculaire

Les systèmes sympathique et parasympathique innervent sensiblement les mêmes viscères et ont généralement des rôles antagonistes l'un de l'autre afin de créer un équilibre dynamique pour le bon fonctionnement de l'organisme. De façon générale, le système sympathique est mis à contribution en situation extrême, c'est-à-dire lors d'un danger imminent nécessitant une fuite ou un combat ou lors de situations de stress ainsi que lors de la pratique d'exercices. Alors que le système parasympathique est plutôt impliqué au repos pour faciliter la digestion (Marieb, 2005; Wehrwein, *et al.*, 2016; Karemaker, 2017). Au niveau du système cardiovasculaire, le système parasympathique contribue à ralentir la fréquence cardiaque et permet la constriction des vaisseaux sanguins coronaires, responsables de l'irrigation du cœur, et des bronchioles, on attribue ainsi son influence au contrôle de la fonction cardiaque. Au contraire, les neurones sympathiques innervent le cœur où ils provoquent une augmentation du rythme cardiaque (RC), les vaisseaux sanguins périphériques où ils induisent une vasoconstriction, les vaisseaux sanguins irriguant les muscles squelettiques, le cerveau et les vaisseaux coronariens où ils produisent une vasodilatation, les poumons où ils induisent une broncho-dilatation, les glandes surrénales et les reins, produisant une panoplie d'effets directs et indirects sur le contrôle des fonctions cardiaques et vasculaires (Marieb, 2005; Brodal, 2010; Karemaker, 2017; Katzung, 2018). Donc, le contrôle neuronal du système cardiovasculaire est gouverné majoritairement par l'activité des nerfs sympathiques, avec un effet cardiaque limité, mais important des nerfs parasympathiques. Il faut donc comprendre que les vaisseaux sanguins étant innervés pratiquement uniquement par le système sympathique, celui-ci est en très grande partie responsable de la régulation de la pression artérielle par ce qu'on appelle le tonus sympathique, c'est-à-dire que les muscles lisses présents dans la paroi des vaisseaux sanguins sont constamment dans un état de constriction partielle. Ainsi, lorsque les besoins du corps changent d'état l'augmentation ou la diminution d'influx nerveux provenant du système sympathique permet de répondre rapidement en provoquant respectivement une vasoconstriction pour augmenter ou une vasodilatation pour diminuer la pression artérielle. Le maintien de l'équilibre de la pression artérielle est en partie contrôlé par les baroréflexes artériels selon le principe de rétrocontrôle négatif (Thomas, 2011; Karemaker, 2017;

Katzung, 2018). Lorsqu'il y a un changement important dans la pression artérielle captée par des récepteurs sensibles à l'étirement dans la paroi du sinus carotidien et de la crosse aortique, appelés barorécepteurs, un signal est envoyé via les nerfs glossopharyngiens et vagues vers le noyau du tractus solitaire (*nucleus tractus solitarius* : NTS) provoquant un changement des efférences des systèmes sympathiques et parasympathiques afin d'ajuster le débit cardiaque et la résistance vasculaire et ramener la pression artérielle à un niveau de base. Ces barorécepteurs sont très sensibles aux variations de l'étirement de la paroi vasculaire, ainsi on constate une réponse phasique de l'influx nerveux, soit une augmentation au moment du début de la systole et une réduction en fin de systole et au cours de la diastole (Thomas, 2011).

#### 7.4.2 Implication de l'axe endothélinergique dans le contrôle autonome

L'expression des gènes ainsi que des protéines associées à l'axe endothélinergique est largement distribuée dans l'ensemble du système nerveux. On y retrouve de l'ET-1 et de l'ET-3 (Matsumoto, *et al.*, 1989; Takahashi, *et al.*, 1991; Kuwaki, *et al.*, 1997), les enzymes de conversion de l'endothéline (ECE)-1 et ECE-2 (Hashim et Tadepalli, 1991; Shinyama, *et al.*, 1991; Warner, *et al.*, 1992a; Warner, *et al.*, 1992b; Xu, *et al.*, 1994; Emoto et Yanagisawa, 1995) de même que les récepteurs ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> (Arai, *et al.*, 1990; Sakurai, *et al.*, 1990). On retrouve plus particulièrement ce peptide et ses récepteurs dans des sites d'importance pour le contrôle central des fonctions autonomes (Giaid, *et al.*, 1989; Jones, *et al.*, 1989; Koseki, *et al.*, 1989; Lee, *et al.*, 1990; MacCumber, *et al.*, 1990; Yoshizawa, *et al.*, 1990; Banasik, *et al.*, 1991). De plus on retrouve une grande activité ECE au niveau de la *médulla oblongata* et de l'hypothalamus (Warner, *et al.*, 1992a). Les effets cardiovasculaires, en particulier l'augmentation de la pression artérielle, de l'administration intra-cisternale (i.c.) ou intra-cérébro-ventriculaire (i.c.v.) d'ET-1 chez le rat est largement attribuable à un changement des signaux provenant du système sympathique (Yamamoto, *et al.*, 1992; Ono et Kaneko, 1995; Kuwaki, *et al.*, 1997). Comme il sera discuté un peu plus loin dans cette introduction, l'administration centrale d'ET-1 chez le rat conscient et anesthésié devient létale à une certaine dose, dû aux effets dépresseurs respiratoires (Ouchi, *et al.*, 1989). De plus, à fortes doses centrales des effets vasoconstricteurs cérébraux ont pu être observés, ayant un impact sur la circulation systémique (Fuxe, *et al.*, 1989; Macrae, *et al.*, 1991;

Shinyama, *et al.*, 1991; Rebello, *et al.*, 1995; Sharkey et Butcher, 1995). Comme mentionné précédemment, la *médulla oblongata* est une structure très importante dans le contrôle du SNA. La surface ventrale de la *médulla oblongata* (*ventral surface of the medulla oblongata* : VSM) est la partie du SNC la plus sensible à l'application locale d'ET-1 et mène aux mêmes effets cardio-respiratoires obtenus avec une administration i.c. d'ET-1 (Kuwaki, *et al.*, 1991). La VSM est située juste à côté de la médulla ventro-latérale rostrale (*rostral ventrolateral medulla* : RVLM) qui se trouve être le site contenant les neurones pré-moteurs dont les axones descendants forment l'entrée excitatrice des neurones pré-ganglionnaires sympathiques de la moelle épinière (Kumada, *et al.*, 1990; Dampney, 1994). Le NTS est le site majeur des projections des fibres afférentes provenant des viscères des nerfs crâniens VII, IX et X. Le sinus carotidien et les nerfs dépresseurs aortiques traversent les nerfs IX et X afin de projeter les afférences dans certains sous-noyaux du NTS (Kuwaki, *et al.*, 1997). L'administration locale d'ET-1 au niveau du NTS, chez le rat anesthésié, produit des effets controversés, soit une élévation de la pression artérielle (Mosqueda-Garcia, *et al.*, 1993; Kuwaki, *et al.*, 1997) soit une réduction de la pression artérielle (Ferguson et Smith, 1990; Hashim et Tadeipalli, 1992) selon la dose d'agoniste administrée ainsi que le site d'injection au niveau du NTS. L'*area postrema* est une région épendymaire spécialisée appelée organe circonventriculaire caractérisée par une absence de BHE permettant donc le passage aux messagers chimiques circulants. Cette zone est interconnectée avec le NTS et avec le noyau moteur dorsal du nerf vague (*dorsal motor nucleus of the vagus nerve* : DMNV) recevant donc des afférences provenant du nerf sinusal carotidien, du nerf vague et des noyaux hypothalamiques dorso-médiaux et para-ventriculaires (Panneton et Loewy, 1980; Hosoya et Matsushita, 1981; Ciriello, 1983; Luiten, *et al.*, 1985). Une administration locale d'ET-1 dans l'*area postrema* provoque une diminution de la pression artérielle (Ferguson et Smith, 1990; Mosqueda-Garcia, *et al.*, 1993). Finalement dans la substance grise périaqueducatale (*periaqueductal grey* : PAG), un groupe de neurones servant à relayer les informations en provenance de l'hypothalamus vers la *médulla oblongata* et connu pour avoir un impact sur les fonctions cardiovasculaires (Kuwaki, *et al.*, 1991), l'administration locale d'ET-1 provoque l'augmentation de la pression artérielle tout en ayant un impact sur le comportement des rats conscients (D'Amico, *et al.*, 1994; D'Amico, *et al.*, 1995; D'Amico, *et al.*, 1996).

Contrairement au modèle de rat, la souris est plus facile à modifier génétiquement, mais il est plus difficile de procéder à l'administration locale de peptides exogènes au niveau central. Les études effectuées grâce aux souris génétiquement modifiées afin de réprimer les différents composants de la voie endothélinergique ont permis de montrer que le peptide endogène pouvait avoir un rôle dans le contrôle physiologique du système cardio-respiratoire, puisque les souris ET-1 KO présentaient de l'hypertension, une suractivité sympathique et un déficit du réflexe respiratoire tous sous le contrôle de la RVLM (Kurihara, *et al.*, 1994; Kuwaki, *et al.*, 1996). De même que les souris réprimées génétiquement pour l'ET-3 et le récepteur ET<sub>B</sub> présentent une pression artérielle plus élevée que leurs congénères de type sauvage (Kuwaki, *et al.*, 1997), en plus de présenter un défaut dans le développement des mélanocytes épidermales et le développement d'un mégacôlon (Baynash, *et al.*, 1994).

#### 7.4.3 Effets de l'administration centrale d'ET-1

Tel que mentionné précédemment, l'ET-1 ainsi que ses récepteurs et l'ECE sont présents au niveau du SNC (Giaid, *et al.*, 1989; Kar, *et al.*, 1991; Kohzuki, *et al.*, 1991; Shinyama, *et al.*, 1991; Niwa, *et al.*, 1992). Le SNC étant imperméable à l'endothéline, des voies d'administration directe au niveau du SNC doivent être employées pour l'étude de l'effet de ce peptide au niveau central. Pour ce faire des techniques d'administration i.c.v., i.c. ou intrathécale (i.t.c.) ont été employées chez le rat conscient et anesthésié (Kawano, *et al.*, 1989; Ouchi, *et al.*, 1989; Giuliani, *et al.*, 1991; Han, *et al.*, 1991; Macrae, *et al.*, 1991).

Des études ont d'abord démontré que les endothélines dans le SNC jouaient un rôle de neurotransmetteurs ou de neuro-modulateurs (Dashwood et Loesch, 2010) en plus d'avoir un impact sur le flot sanguin cérébral (Macrae, *et al.*, 1991) et sur le système cardiovasculaire (Mosqueda-Garcia, *et al.*, 1993; Rebello, *et al.*, 1995).

##### 7.4.3.1 Effets cardiovasculaires de l'administration centrale d'ET-1

Gulati *et al.* (1997) ont rapporté que la chute de pression artérielle observée suite à l'administration cérébro-ventriculaire d'ET-1 est accompagnée par une chute de l'activité sympathique via l'activation des récepteurs ET<sub>A</sub> (Gulati, *et al.*, 1997). Alors que d'autres

groupes ont plutôt démontré qu'une administration i.c.v. ou i.t.c. d'ET-1 produisait, chez le rat anesthésié, une augmentation de la pression artérielle moyenne (PAM) accompagnée par une élévation des niveaux de catécholamines sériques (Ouchi, *et al.*, 1989; Macrae, *et al.*, 1991). Par la suite Poulat *et al.* ont rapporté en 1994, que ce même type d'augmentation de pression artérielle était mesuré chez le rat conscient suite à l'administration i.t.c. d'ET-1 ou de son précurseur, la big-ET-1 (Poulat, *et al.*, 1994). Dans cette étude, il a aussi été montré que l'ET-1 administrée au niveau central produisait des effets toxiques létaux à de faibles doses auxquelles les rats semblaient développer une désensibilisation n'affectant pas la réponse pressive à ce peptide. De plus, ces effets toxiques, de même que les réponses cardiovasculaires obtenues suite à l'administration centrale d'ET-1 sont dépendants de la présence du récepteur ET<sub>A</sub>, dont d'autres études avaient précédemment montré la présence au niveau de la moelle épinière chez le rat (Gulati, 1991; Bertelsen, *et al.*, 1992).

De plus, cette étude de Poulat *et al.* a aussi montré que l'augmentation de la pression artérielle suite à l'administration d'ET-1 i.t.c. n'était pas attribuable à un passage du peptide vers la circulation périphérique puisque la BHE est imperméable à l'ET-1 (Mima, *et al.*, 1989; Kadel, *et al.*, 1990; Rubanyi et Polokoff, 1994), mais bien un effet stimulant du système sympathique puisqu'un traitement avec la phentolamine, un antagoniste des récepteurs  $\alpha$ -adrénergiques, permet de bloquer la réponse à l'ET-1 i.t.c. (Poulat, *et al.*, 1994) alors que ce même traitement n'a pas d'effet lorsque le peptide est administré par voie veineuse (Yanagisawa, *et al.*, 1988). De plus, des études ont montré que les effets presseurs suite à l'administration i.t.c. n'étaient pas induits par une structure supraspinale puisque des peptides administrés par cathétérisation spinale demeurent près du site d'administration (Cridland, *et al.*, 1987; Suter et Coote, 1987; Fairbanks, 2003).

#### 7.4.3.2 Facteurs à considérer pour l'étude de la réponse cardiovasculaire à l'administration centrale d'ET-1

Un élément important pouvant influencer la réponse pressive à l'ET-1 au niveau spinal est le site d'administration. En effet, deux études ayant utilisé deux techniques légèrement différentes de cathétérisation spinale pour l'administration du peptide pour laquelle l'une permet l'injection au niveau lombosacré de la moelle épinière et l'autre dans la région T10

ont permis d'observer des résultats différents. Dans la première, il y a une élévation de la pression artérielle dépendante de la dose d'ET-1 administrée d'environ 25 à 35 mm Hg alors que dans la deuxième ils obtiennent une réduction de la pression artérielle dose-dépendante d'environ 10 à 20 mm Hg pour la même échelle de doses que dans la première étude (Giuliani, *et al.*, 1991; Han, *et al.*, 1991). Un autre constat que l'étude de Poulat *et al.* en 1994 a permis de démontrer est que la bradycardie suivant l'administration spinale d'ET-1 est induite par le réflexe vagal (Poulat, *et al.*, 1994).

Aussi des différences peuvent être observées quant aux réponses cardiovasculaires induites par l'administration centrale d'ET-1 chez les rats anesthésiés et conscients. En effet, dans une étude chez le rat anesthésié dans laquelle une administration i.t.c. d'ET-1 provoquait une augmentation de la PAM, l'utilisation d'un prétraitement avec une molécule bloquant la neurotransmission sympathique réduisait la variation de pression artérielle induite par l'ET-1 administrée subséquemment (Giuliani, *et al.*, 1991). Alors qu'un prétraitement avec du pentolinium, un bloqueur ganglionnaire nicotinique, permettait, chez le rat conscient, de réduire la bradycardie provoquée par l'administration spinale d'ET-1 sans avoir d'incidence sur l'augmentation de la pression artérielle (Poulat, *et al.*, 1994) ainsi que d'abolir l'augmentation de la perméabilité vasculaire pulmonaire induite par l'administration i.t.c. d'ET-1 (Poulat et Couture, 1998).

Un autre élément à considérer lors de l'étude d'agents d'intérêts directement au niveau central est les caractéristiques physico-chimiques de la drogue à l'étude. En effet ces caractéristiques, par exemple la densité de la substance par rapport à la densité du liquide céphalorachidien (aussi appelé baricité) ou la lipophilicité/hydrophilicité de la drogue, peuvent avoir un impact direct sur la distribution du produit dans les compartiments tissulaires (Hocking et Wildsmith, 2004). Étant donné la composition tissulaire particulière de la moelle épinière, la myéline, très riche en lipides, peut avoir une incidence sur la distribution des drogues administrées au niveau spinal (Fairbanks, 2003). De même les propriétés pharmacocinétiques des produits au niveau spinal diffèrent de ces mêmes propriétés au niveau systémique (Shafer et Shafer, 1999). Aussi, les drogues administrées directement au niveau spinal peuvent s'avérer toxiques et provoquer des effets indésirables comme de l'inflammation, une démyélinisation ou la mort (Fairbanks, 2003). D'ailleurs

Poulat *et al.* ont bien démontré les effets létaux de l'ET-1 lorsqu'administrée par voie i.t.c. chez le rat (Poulat, *et al.*, 1994).

#### 7.4.3.3 Administration centrale (i.t.c.) chez la souris

Selon la recension des écrits effectuée dans le cadre de la préparation de cette thèse, ce type d'étude des effets cardiovasculaires induits par une administration centrale d'ET-1, ou tout autre agent susceptible d'induire une réponse pressive lorsqu'administré par voie centrale, n'a pas été réalisé chez la souris. Toutefois, plusieurs études sur la douleur ont été réalisées dans ce modèle animal (Fairbanks, 2003). En fait, une technique de ponction lombaire directe chez la souris consciente a été décrite en 1980 permettant d'administrer des drogues au niveau de l'espace entre les vertèbres lombaires 5 et 6 (Hylden et Wilcox, 1980). L'un des avantages majeurs de cette technique est de pouvoir administrer la molécule d'intérêt directement chez l'animal conscient, sans nécessiter d'anesthésier l'animal à des fins de cathétérisation et sans obligation de laisser un temps de récupération post-opératoire. Toutefois, il n'est pas possible de valider le site d'administration du produit puisque l'aiguille utilisée pour effectuer l'injection est retirée aussitôt que celle-ci est réalisée. Bien que cette technique soit sans douleur, la manipulation de l'animal conscient peut mener à un certain niveau de stress temporaire pouvant avoir une incidence sur les mesures désirées.

### 7.5 Rôles de l'interleukine 33 (IL-33) dans la SEP

Comme il sera vu dans les sections suivantes, l'IL-33 a été montrée dans certaines maladies neurodégénératives dont la SEP. De plus puisque la chymase est l'une des enzymes impliquées dans le clivage de l'IL-33 sous une forme libre ayant une activité plus importante nous nous sommes intéressés à cette interleukine dans le cadre du deuxième article intégré à cette thèse.



### 7.5.1 Présentation de l'IL-33

L'IL-33 est une « nouvelle » cytokine décrite au début des années 2000 (Schmitz, *et al.*, 2005). D'abord décrite en tant que protéine nucléaire désignée sous le nom *nuclear factor from high endothelial venules* (NF-HEV) dont la localisation chromosomique humaine se situe sur le bras court du chromosome 9 (Baekkevold, *et al.*, 2003) et sur la région synténique du chromosome 19 chez la souris (Schmitz, *et al.*, 2005). Il est maintenant reconnu qu'il s'agit d'une cytokine associée à la chromatine nucléaire (Carriere, *et al.*, 2007). Elle fait partie de la famille des IL-1 (Schmitz, *et al.*, 2005) reconnues pour altérer la réponse de l'hôte vis-à-vis une attaque immunitaire, infectieuse ou inflammatoire (Dinarello, 1988). Tout comme les autres membres de cette famille de cytokines, l'IL-33 présente une structure secondaire en trèfle bêta (Lingel, *et al.*, 2009). Elle contient, au niveau de sa partie N-terminale, une structure hélice-coude-hélice semblable à un homéodomaine qui est important pour sa localisation nucléaire, son association avec l'hétérochromatine et son activité répressive transcriptionnelle (Baekkevold, *et al.*, 2003; Carriere, *et al.*, 2007).

Il existe deux formes de l'IL-33, soit la forme nucléaire et la forme libre. Sous sa forme nucléaire, elle est liée à l'histone (Roussel, *et al.*, 2008), son rôle serait alors de moduler l'expression de certains gènes codant pour des cytokines via son interaction avec le facteur de transcription *nuclear factor  $\kappa$ B* (NF- $\kappa$ B) (Ali, *et al.*, 2011). Un processus de libération de cette cytokine survient lorsque les cellules subissent des dommages nécrotiques ou des stress, ce qui a mené la communauté scientifique à supposer que celle-ci agissait en tant qu'alarmine pour le système immunitaire (De la Fuente, *et al.*, 2015; Martin et Martin, 2016; Travers, *et al.*, 2018).

La protéine pleine longueur peut être clivée par des protéases issues des neutrophiles et des mastocytes et être libérée sous une forme mature plus courte qui semble avoir une activité de 10 à 30 fois plus importante que la forme nucléaire (Figure 13) (Lefrancais, *et al.*, 2012; Lefrancais, *et al.*, 2014; Roy, *et al.*, 2014). Son activité peut également être régulée par l'action des caspases-1, -3 et -7; une fois clivée, cette forme de l'IL-33 devient inactive (Cayrol et Girard, 2009; Luthi, *et al.*, 2009; Ali, *et al.*, 2010; Lefrancais et Cayrol, 2012).

L'IL-33 est constitutivement exprimée par plusieurs types de cellules dont les cellules endothéliales, les cellules épithéliales (Moussion, *et al.*, 2008; Pichery, *et al.*, 2012) et par les cellules gliales au niveau du SNC (Pichery, *et al.*, 2012; Gadani, *et al.*, 2015). Son expression peut également être induite sous certaines conditions inflammatoires (Byers, *et al.*, 2012; Talabot-Ayer, *et al.*, 2012; Hardman, *et al.*, 2013).

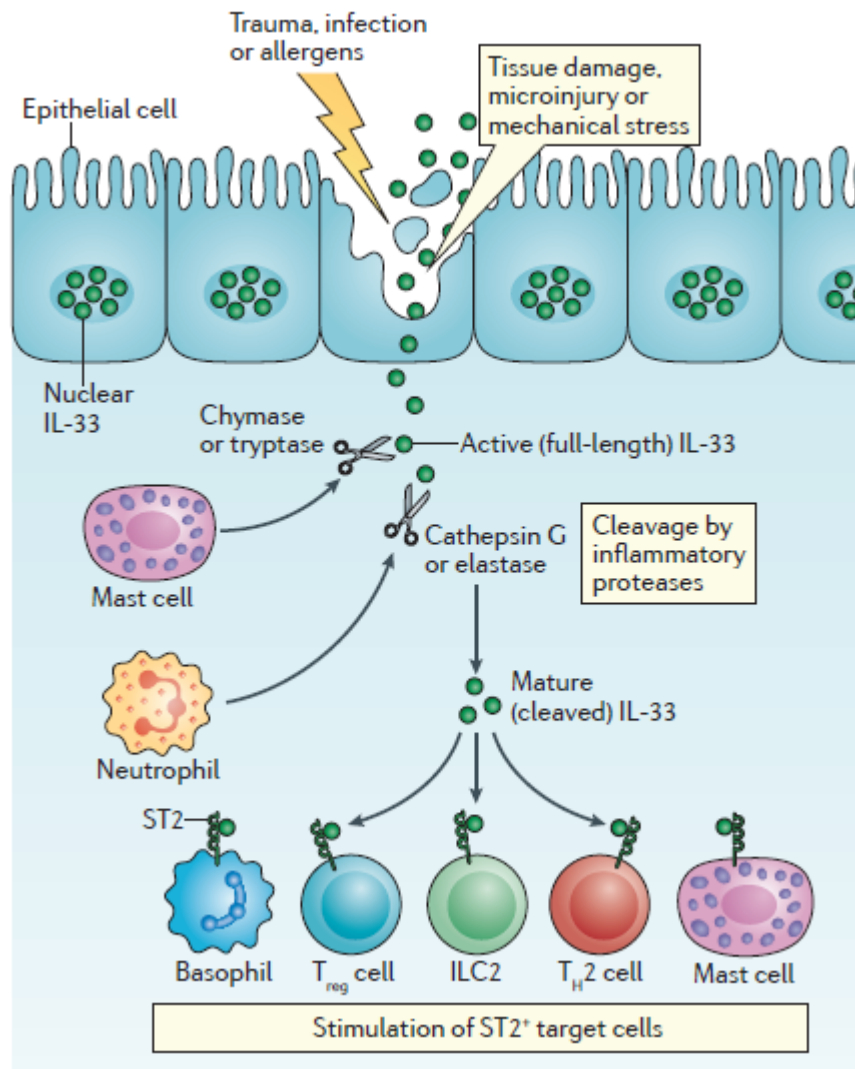


Figure 13 : Mécanismes proposés pour l'augmentation de l'activité de l'IL-33.

[Figure 2a de (Liew, *et al.*, 2016) reproduite avec la permission].

### 7.5.2 Les récepteurs de l'IL-33

L'IL-33 se lie au récepteur transmembranaire de type *Toll-like receptor*, le ST2, présent à la membrane de très nombreux types cellulaires dont entre autres sur les mastocytes et les cellules Th2 (Lohning, *et al.*, 1998; Moritz, *et al.*, 1998; Coyle, *et al.*, 1999; Townsend, *et al.*, 2000). Cette liaison permet l'hétérodimérisation avec le récepteur IL-1RAcP (Lingel, *et al.*, 2009; Liu, *et al.*, 2013) et permet ensuite la signalisation intracellulaire dont les voies classiques de la famille de l'IL-1 soit les voies NF- $\kappa$ B et *mitogen-activated protein kinases* (MAPK) (Figure 14) (Brint, *et al.*, 2002; Dunne et O'Neill, 2003; Chackerian, *et al.*, 2007).

Il existe quatre formes du récepteur ST2 issues de l'épissage alternatif, soit la forme liée aux membranes (ST2L), la forme soluble (sST2), la forme ST2V identique au sST2, mais n'exprimant pas le troisième domaine extracellulaire d'immunoglobuline et la forme ST2VL n'ayant pas de domaine transmembranaire et décrit uniquement chez le poulet (Yanagisawa, *et al.*, 1993; Bergers, *et al.*, 1994; Tominaga, *et al.*, 1999; Li, *et al.*, 2000; De la Fuente, *et al.*, 2015). On retrouve le récepteur ST2L chez les fibroblastes, les mastocytes, les éosinophiles, les lymphocytes Th2, les cellules dendritiques et de façon induite sur les macrophages (Bergers, *et al.*, 1994; Lohning, *et al.*, 1998; Moritz, *et al.*, 1998; Coyle, *et al.*, 1999; Cherry, *et al.*, 2008; Kurowska-Stolarska, *et al.*, 2009; Rank, *et al.*, 2009). Le récepteur sST2 est exprimé par les mastocytes, les fibroblastes et par les cellules endothéliales qui ont été induites par les cytokines (Bergers, *et al.*, 1994; Rossler, *et al.*, 1995; Kumar, *et al.*, 1997). Cette version soluble du récepteur semble être une autre façon de réguler l'activité de cette cytokine en séquestrant l'IL-33 et donc bloquant la réponse pro-inflammatoire induite par celle-ci (Schmitz, *et al.*, 2005; Hayakawa, *et al.*, 2007; Liew, *et al.*, 2016).

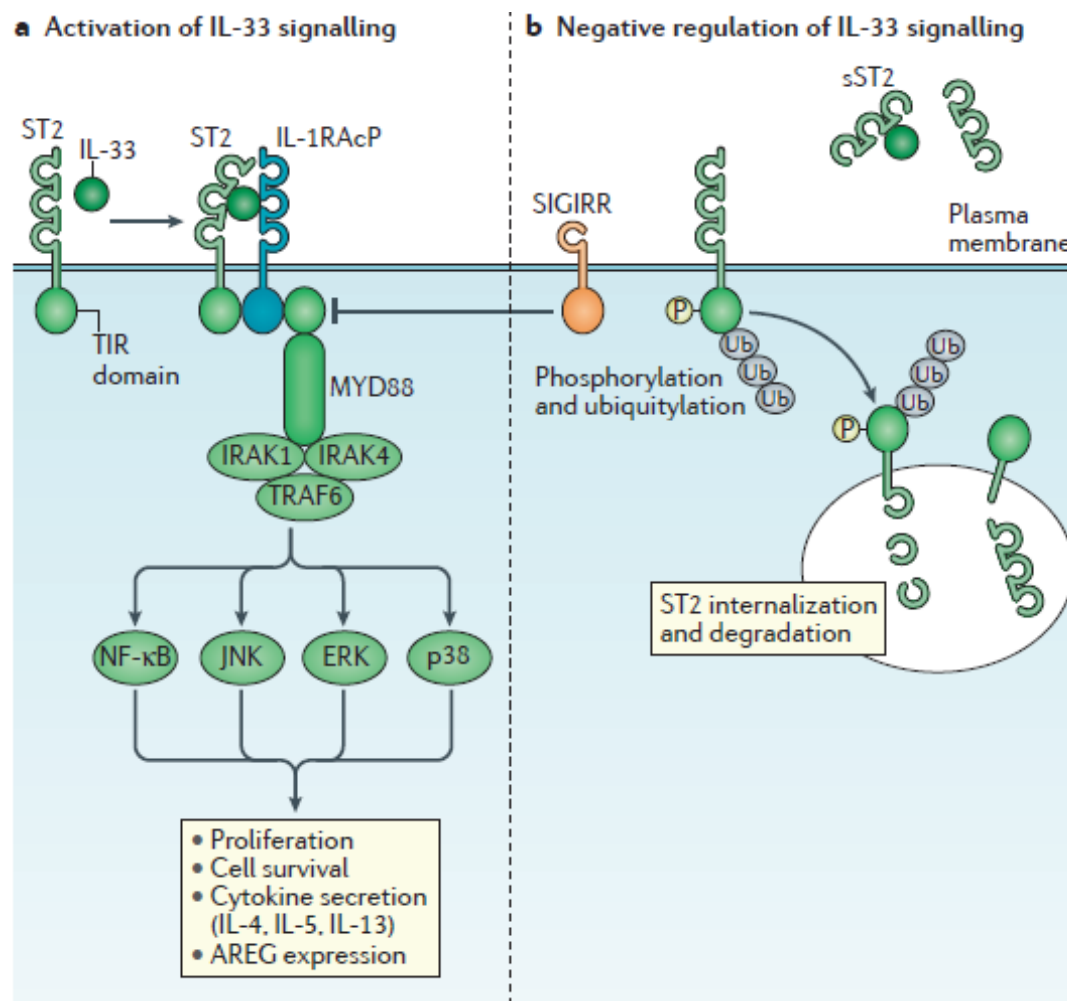


Figure 14 : Signalisation et régulation négative de la signalisation de l'IL-33.

[Figure 3 de (Liew, *et al.*, 2016) reproduite avec la permission].

### 7.5.3 Rôles en conditions normales et pathologiques de l'IL-33

Plusieurs rôles ont été imputés à cette cytokine et les effets dépendent du type cellulaire activé, ceux-ci inclus la prolifération, la survie et la migration des cellules lymphoïdes et myéloïdes, la production de médiateurs immunitaires de type 2 (IL-5, IL-13), l'augmentation de la différenciation des cellules T dont les Th2, les Tregs et les *type 2 lymphoid cells* (ILC2s) (Lott, *et al.*, 2015; Molofsky, *et al.*, 2015; Peine, *et al.*, 2016), la polarisation des macrophages en type M2 (Kurowska-Stolarska, *et al.*, 2009) et l'expression de *epidermal growth factor-like molecule amphiregulin* (AREG) (Arpaia, *et al.*, 2015) permettant l'amélioration des fonctions immunitaires régulatrices et le support de la réparation tissulaire (Zaiss, *et al.*, 2015). La Figure 15 schématise certains de ces rôles selon le type cellulaire immunitaire (De la Fuente, *et al.*, 2015).

En lien avec tous ces rôles, l'axe IL-33/ST2 a été démontré augmenté dans plusieurs pathologies au niveau systémique, par exemple dans des désordres respiratoires comme l'asthme ou les allergies (Prefontaine, *et al.*, 2009; Prefontaine, *et al.*, 2010; Kamekura, *et al.*, 2012), dans des maladies inflammatoires de l'intestin comme les colites ulcéreuses et la maladie de Crohn (Beltran, *et al.*, 2010; Pastorelli, *et al.*, 2010; Sponheim, *et al.*, 2010), dans l'arthrite rhumatoïde (Tang, *et al.*, 2013) et les maladies de la peau comme la dermatite atopique, le psoriasis et le vitiligo (Tang, *et al.*, 2013). Plus particulièrement en lien avec la forme soluble du récepteur, des études ont démontré une élévation des niveaux de sST2 sériques chez l'Homme lors de pathologies telles que l'asthme (Oshikawa, *et al.*, 2001; Ali, *et al.*, 2009; Watanabe, *et al.*, 2018), l'inflammation allergique des voies respiratoires (Tajima, *et al.*, 2003; Bajwa, *et al.*, 2015; Vocca, *et al.*, 2015; Zhao et Zhao, 2015), l'infarctus du myocarde (Weinberg, *et al.*, 2003; Shimpo, *et al.*, 2004; Weir, *et al.*, 2010; Broch, *et al.*, 2012) et le choc septique (Brunner, *et al.*, 2004; Hoogerwerf, *et al.*, 2010; Parenica, *et al.*, 2012). De plus, des effets bénéfiques ont été montrés lors de l'administration de sST2 dans des modèles animaux pathologiques (Coyle, *et al.*, 1999; Sweet, *et al.*, 2001; Leung, *et al.*, 2004; Yin, *et al.*, 2012; De Grove, *et al.*, 2018).

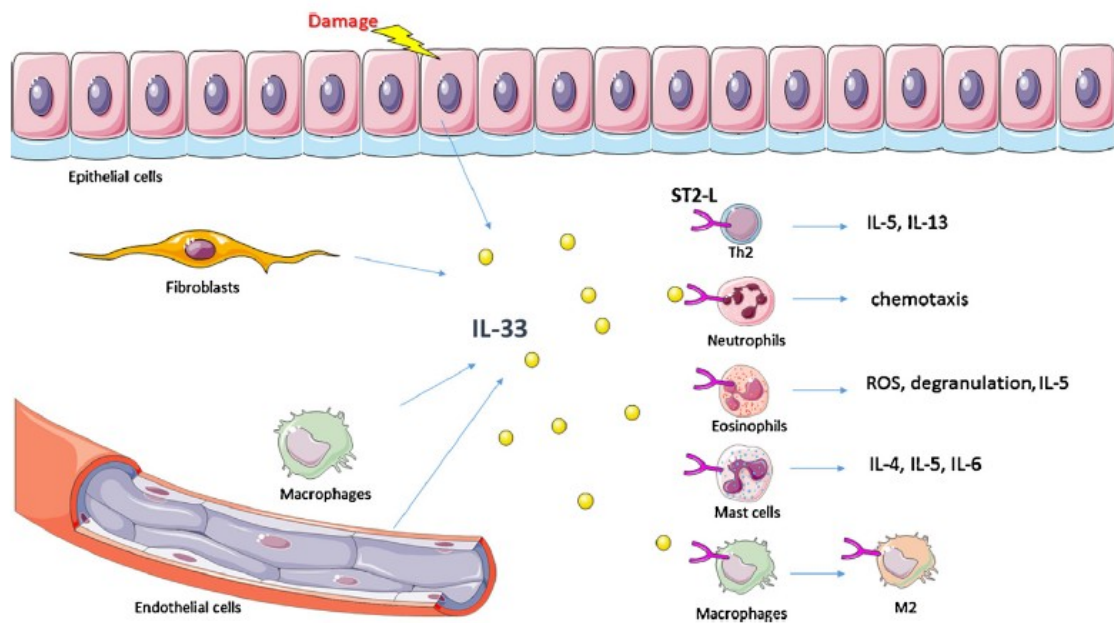


Figure 15 : Rôles de la signalisation induite par l'IL-33 dans la réponse immunitaire.

[Figure 2 de (De la Fuente, *et al.*, 2015) reproduite avec la permission].

#### 7.5.4 L'IL-33 dans le SNC

Le SNC présente le plus haut niveau d'expression d'IL-33 parmi les organes étudiés (Schmitz, *et al.*, 2005). L'IL-33 est exprimée de façon constitutive par les cellules endothéliales cérébrales, les astrocytes et les oligodendrocytes, mais pas par la microglie et les neurones (Yasuoka, *et al.*, 2011; Reverchon, *et al.*, 2017; Yang, *et al.*, 2017). Quant aux récepteurs, les cellules endothéliales expriment la forme soluble du récepteur (sST2) et le co-récepteur IL-1RAcP, les astrocytes et les cellules microgliales expriment le récepteur membranaire (ST2), la forme soluble (sST2) et le co-récepteur IL-1RAcP alors que les neurones expriment uniquement le co-récepteur IL-1RAcP (Yasuoka, *et al.*, 2011). Durant le développement du SNC, l'expression de l'IL-33 est élevée au moment du développement post-natal chez la souris (Wicher, *et al.*, 2013). Le rôle physiologique proposé au niveau du SNC est similaire à celui au niveau systémique, c'est-à-dire induire la production de cytokines pro-inflammatoires, induire la prolifération microgliale et réguler à la hausse la phagocytose (Yasuoka, *et al.*, 2011).

#### 7.5.5 Contribution de l'IL-33 dans les maladies neurodégénératives

Tous ces rôles ont mené à l'étude de l'implication de cette cytokine dans des maladies neurodégénératives caractérisées par un état inflammatoire au niveau central telle la maladie d'Alzheimer et la SEP de même que dans la réparation tissulaire suite à des dommages traumatiques. Dans le cas de la maladie d'Alzheimer, l'IL-33 et son récepteur ST2 sont fortement exprimés dans les environs des plaques amyloïdes et des enchevêtrements neurofibrillaires des cellules gliales (Xiong, *et al.*, 2014). Chez la souris, l'IL-33 joue un rôle important dans la réparation neuronale dans le cerveau âgé et son absence permet le dépôt anormal de la protéine Tau (Carlock, *et al.*, 2017). De plus, l'administration d'IL-33 atténue les signes pathologiques en promouvant le recrutement et l'activité phagocyte des cellules microgliales via la régulation de la réponse inflammatoire (Fu, *et al.*, 2016).

Chez les patients atteints de SEP, les niveaux d'IL-33 a été mesurée à la hausse dans le sérum (Alsahebhosoul, *et al.*, 2017), dans le liquide céphalo-rachidien (Sosvorova, *et al.*, 2015; Jafarzadeh, *et al.*, 2016) et au niveau des cellules du SNC (Christophi, *et al.*, 2012;



Allan, *et al.*, 2016) de même qu'il a été montré que le niveau du récepteur ST2 est augmenté au niveau central (Allan, *et al.*, 2016; Zandee, *et al.*, 2017). Afin d'expliquer le rôle de cette cytokine dans la SEP, des études ont été menées avec des cultures cellulaires de précurseurs d'oligodendrocytes et avec des modèles murins. *In vitro*, l'administration d'IL-33 aide à la réparation de la myéline et promeut la différenciation des cellules progénitrices des oligodendrocytes vers une forme mature et productrice de myéline (Natarajan, *et al.*, 2016).

Les résultats dans le modèle EAE semblent toutefois contradictoires selon les souches de souris utilisées de même que selon les types de traitements incluant la voie d'administration, les doses employées ou le moment choisi pour procéder au traitement. Ainsi certaines études ont montré des effets bénéfiques de l'IL-33 et de la présence du récepteur ST2 via une réduction des cytokines pro-inflammatoires et l'augmentation de cytokines anti-inflammatoires et donc influençant les réponses immunitaires et les cellules gliales (Jiang, *et al.*, 2012; Milovanovic, *et al.*, 2012; Chen, *et al.*, 2015; Xiao, *et al.*, 2018). Alors que d'autres ont plutôt montré un effet néfaste de l'IL-33 par l'augmentation de cytokines pro-inflammatoires et la réduction de la myélinisation (Li, *et al.*, 2012a; Allan, *et al.*, 2016).

## 7.6 Le TNF- $\alpha$

Le TNF- $\alpha$  est une importante cytokine ayant de nombreux rôles dans le maintien de l'homéostasie de l'organisme, mais également dans certaines pathologies inflammatoires comme la SEP. Cette cytokine traverse la BHE par un système de transport spécifique saturable (Gutierrez, *et al.*, 1993). Le TNF- $\alpha$  peut être produit sous forme transmembranaire ou soluble (Kriegler, *et al.*, 1988; Black, *et al.*, 1997; Moss, *et al.*, 1997). Dans un modèle de choc septique, la chymase murine de type mMCP-4 (soit l'homologue murin de la chymase humaine), dégrade le TNF- $\alpha$ , tant sous sa forme soluble que transmembranaire, sans toutefois avoir d'impact substantiel sur l'expression génique ou protéique de cette cytokine (Piliponsky, *et al.*, 2012).

Le TNF- $\alpha$  induit ses effets par l'activation de deux sous-types de récepteurs, soit le TNFR1 et le TNFR2 (Grell, *et al.*, 1995). Ces deux récepteurs sont présents sur de nombreux

types cellulaires systémiques, mais également au niveau du SNC. Alors que le TNFR1 est ubiquitaire et exprimé de façon constitutive, le TNFR2 est exprimé seulement sur les cellules immunitaires, les cellules endothéliales et plusieurs types cellulaires du SNC (Probert, 2015). Dans le SNC se sont les cellules microgliales qui sont les plus grandes productrices de TNF- $\alpha$ , mais cette cytokine peut également être produite par les astrocytes et les cellules épendymaires du plexus choroïde en réponse à un stimulus inflammatoire (Lieberman, *et al.*, 1989; Sawada, *et al.*, 1989; Chung et Benveniste, 1990) ou par les neurones et les cellules immunitaires infiltrantes en conditions pathologiques (Liu, *et al.*, 1994; Botchkina, *et al.*, 1997).

L'activation du récepteur TNFR1 mène, selon le complexe activé, à différentes cascades de signalisation impliquées dans l'inflammation (Micheau et Tschopp, 2003; Walczak, 2011), la dégénérescence tissulaire, l'activation des cellules immunitaires (Mehta, *et al.*, 2018), la survie et la prolifération cellulaire, mais également à l'apoptose (Wallach, *et al.*, 1999; Micheau et Tschopp, 2003; Wang, *et al.*, 2008; Wilson, *et al.*, 2009) et la nécrose programmée (Sun, *et al.*, 2012; Pasparakis et Vandenabeele, 2015). Alors que l'activation du récepteur TNFR2, également impliqué dans l'activation du système immunitaire et des processus inflammatoires, entraîne plutôt des événements cellulaires impliqués dans la réparation tissulaire, la survie et la prolifération cellulaire (Probert, 2015) (Figure 16). Tous ces processus de signalisation induits par l'activation des récepteurs par le TNF- $\alpha$  doivent être finement régulés et lorsqu'il y a un manquement dans cette régulation, on constate que le TNF- $\alpha$  est alors impliqué dans certaines physiopathologies inflammatoires auto-immunes comme l'arthrite rhumatoïde (Keffer, *et al.*, 1991; Kontoyiannis, *et al.*, 1999) pour laquelle l'utilisation de médicaments ciblant cette cytokine a été approuvée (Monaco, *et al.*, 2015). Il est à noter toutefois que les études cliniques chez les patients SEP ayant utilisé des molécules non-sélectives ciblant le TNF- $\alpha$  et ses récepteurs ont été abandonnées étant donné l'aggravation des symptômes des patients traités (van Oosten, *et al.*, 1996; MSStudyGroup, *et al.*, 1999; Alnasser Alsukhni, *et al.*, 2016). Ces études ont permis de montrer que contrairement à ce qui se produit en périphérie, le TNF- $\alpha$  et ses récepteurs ont, au niveau du SNC, un double effet bénéfique et délétère en conditions physiopathologiques. Ainsi donc le rôle de cette cytokine dans la SEP est ambigu (van Oosten, *et al.*, 1996; MSStudyGroup, *et*

*al.*, 1999; Probert, 2015). En effet, le TNF- $\alpha$  favorise la régénération tissulaire par exemple dans la remyélinisation (Arnett, *et al.*, 2001). Comme mentionné précédemment, le TNF- $\alpha$  peut induire l'inflammation et le recrutement des cellules immunitaires et ainsi promouvoir la destruction tissulaire par l'activation du récepteur TNFR1 (Kalliolias et Ivashkiv, 2016). Aussi en conditions pathologiques, le TNF- $\alpha$  induit l'adhérence des cellules immunitaires aux vaisseaux sanguins cérébraux par l'augmentation de l'expression de molécules d'adhésion comme la protéine 1 d'adhésion cellulaire vasculaire (*vascular cell adhesion protein 1* : VCAM) et la molécule d'adhésion inter-cellulaire (*intercellular adhesion molecule* : ICAM) (Pober et Cotran, 1990), mais contribue également à la dérégulation des propriétés de la BHE (de Vries, *et al.*, 1996). Toutefois l'activation des récepteurs TNFR2 sur les cellules Treg, les oligodendrocytes et les astrocytes permet la régulation immunitaire, la survie cellulaire et la remyélinisation (Probert, 2015). Ainsi donc les effets bénéfiques ou délétères aux niveaux pathophysiologiques semblent être dépendants des voies de signalisation cellulaire activées par cette cytokine.

En lien direct avec la seconde étude présentée dans le cadre de cette thèse, le TNF- $\alpha$  contribue à la régulation de l'expression de l'IL-33 dans divers types cellulaires systémiques comme au niveau de la peau (Balato, *et al.*, 2014), chez les kératinocytes (Meephansan, *et al.*, 2014), dans les cellules musculaires lisses des voies respiratoires (Prefontaine, *et al.*, 2009) et également au niveau des cellules épithéliales nasales (Park, *et al.*, 2016) et des fibroblastes nasaux (Nomura, *et al.*, 2012). Cette régulation s'effectue autant au niveau de l'expression génique de l'IL-33, c'est-à-dire une augmentation de l'expression de l'ARNm de cette cytokine, qu'au niveau protéique. De plus la régulation de l'IL-33 est dépendante de la dose et du temps de traitement au TNF- $\alpha$  appliqué au niveau de cultures cellulaires. Certaines de ces études ont même démontré que la stimulation de l'expression de l'IL-33 par le TNF- $\alpha$  se produit par l'activation des voies de signalisation ERK et p38 chez les cellules épithéliales nasales primaires et les cellules A549 (Park, *et al.*, 2016), par les voies phosphoinositide 3-kinase (PI3K) et JNK chez les fibroblastes nasaux (Nomura, *et al.*, 2012) et par la voie NF- $\kappa$ B (Nomura, *et al.*, 2012; Park, *et al.*, 2016).

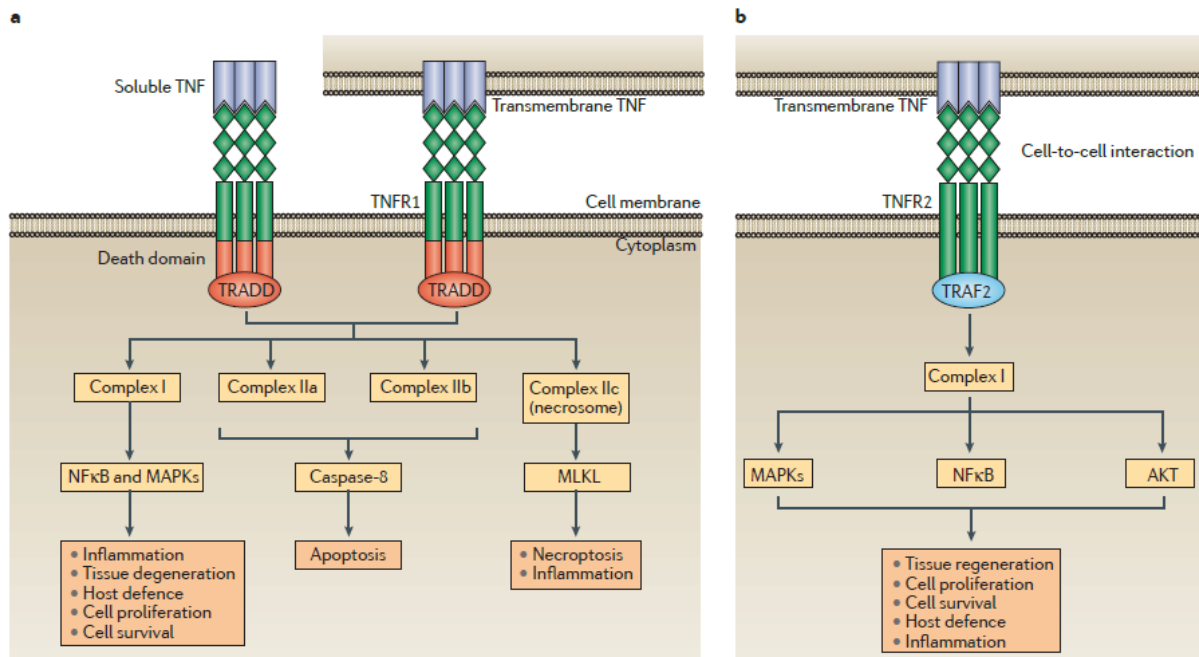


Figure 16: Les voies de signalisation et rôles bioactifs des récepteurs du TNF- $\alpha$ .

[Figure 1 de (Kalliolias et Ivashkiv, 2016) reproduite avec la permission].

## **8. QUESTION PRINCIPALE**

La chymase, une protéase mastocytaire, joue-t-elle un rôle fonctionnel dans un modèle de souris de sclérose en plaques (c'est-à-dire l'encéphalopathie auto-immune expérimentale) ?

## **9. HYPOTHÈSE UNIFICATRICE**

La protéase mastocytaire de type 4 (mMCP-4) joue un rôle délétère dans l'encéphalopathie auto-immune expérimentale.

## **10. BUT DE L'ÉTUDE**

Identifier le rôle de la protéase mastocytaire de souris de type 4 et mesurer son activité fonctionnelle dans un modèle de souris de SEP.

## **11. OBJECTIFS SPÉCIFIQUES**

- ✓ Démontrer que la mMCP-4 est impliquée dans l'EAE.
- ✓ Suggérer un mécanisme expliquant la protection observée en phase précoce de l'EAE chez les souris mMCP-4 KO.
- ✓ Mesurer l'activité fonctionnelle de la mMCP-4 dans un modèle de souris d'EAE en condition non anesthésiée.

## **12. ARTICLE 1**

### 12.1 Titre

**Significant contribution of mouse mast cell protease 4 in early phases of experimental autoimmune encephalomyelitis**

### 12.2 Auteurs de l'article

Louisane Desbiens, Catherine Lapointe, Marjan Gharagozloo, Shaimma Mahmoud, Gunnar Pejler, Denis Gris, Pedro D'Orléans-Juste

### 12.3 Statut de l'article

Publié dans *Mediators of Inflammation*

Référence : Desbiens L, Lapointe C, Gharagozloo M, Mahmoud S, Pejler G, Gris D, D'Orléans-Juste P. 2016. Significant Contribution of Mouse Mast Cell Protease 4 in Early Phases of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Mediators of Inflammation* 2016: 9797021

### 12.4 Avant-propos

Ma contribution dans cet article fut d'émettre l'hypothèse, de développer le protocole expérimental, d'effectuer la plupart des expériences et d'avoir contribué significativement à toutes les étapes de rédaction de l'article. Certaines corrections ont été apportées au document original afin de prendre en considération les corrections proposées par les juges de cette thèse. De plus la version du manuscrit présentée dans cette thèse a été adaptée depuis le document final publié dans *Mediators of inflammation* afin de répondre aux exigences de l'Université c'est-à-dire que les figures et leurs légendes associées ont été placées aux bons

endroits dans le texte et la numérotation de celles-ci ainsi que la numérotation des sections ont été modifiées afin d'être intégrées dans le présent ouvrage. Toutefois les numéros originaux des figures apparaissent sous la nouvelle numérotation.

## 12.5 Résumé en français

L'encéphalopathie auto-immune expérimentale (EAE) est un modèle murin reproduisant les principaux signes cliniques, histopathologiques et immunologiques de la sclérose en plaques (SEP). Il a été suggéré que les mastocytes étaient impliqués dans les principales phases inflammatoires se produisant pendant le développement de l'EAE, éventuellement en sécrétant plusieurs autacoïdes et protéases. Parmi ces dernières, nous avons suggéré que la protéase mastocytaire de type 4 de la souris (mMCP-4) pouvait contribuer à la réponse inflammatoire en produisant, entre autres de l'endothéline-1 (ET-1). Le but de cette étude fut donc de déterminer l'impact de la mMCP-4 sur les stades inflammatoires aigus de l'EAE. Des souris C57Bl/6 de type sauvage (WT) ou mMCP-4 *knockout* (KO) ont été immunisées avec la glycoprotéine oligodendrocytaire de la myéline (MOG<sub>35-55</sub>) dans un adjuvant complet de Freund suivi d'une toxine de la coqueluche. Les souris WT immunisées en EAE présentaient une phase aiguë initiale caractérisée par des augmentations progressives de l'échelle clinique, qui étaient significativement réduites chez les souris mMCP-4 KO au cours des premières semaines de développement de la pathologie. De plus, des taux plus élevés de myéline spinale ont été trouvés chez les souris mMCP-4 KO par rapport aux souris WT. Enfin, alors que l'EAE a induit des augmentations significatives des taux cérébraux d'ARNm de la mMCP-4 et des taux cérébraux d'ET-1 immunoréactive chez les souris WT, ce dernier peptide a été réduit à des niveaux de base chez les congénères de type mMCP-4 KO. La présente étude confirme donc le rôle joué par la mMCP-4 dans les phases inflammatoires précoces de la maladie dans un modèle murin de SEP.



12.6 Manuscrit original

# **SIGNIFICANT CONTRIBUTION OF MOUSE MAST CELL PROTEASE 4 IN EARLY PHASES OF EXPERIMENTAL AUTOIMMUNE ENCEPHALOMYELITIS**

Louisane Desbiens, Catherine Lapointe, Marjan Gharagozloo, Shaimaa Mahmoud, Gunnar Pejler<sup>2,3</sup>, Denis Gris<sup>1,†</sup> Pedro D'Orléans-Juste<sup>†\*</sup>

Department of Pharmacology and <sup>1</sup>Department of Pediatrics, Program of Immunology, Medical School, Université de Sherbrooke, 3001, 12th Avenue North, Sherbrooke, Québec, J1H 5N4, Canada; <sup>2</sup> Department of Medical Biochemistry and Microbiology, Uppsala University BMC, Box 582, 75123 Uppsala, Sweden; <sup>3</sup> Swedish University of Agricultural Sciences, Dept of Anatomy, Physiology and Biochemistry, Uppsala, Sweden, <sup>†</sup>Authors contributed equally to this study.

\* Corresponding author at: Department of Pharmacology and Physiology, Université de Sherbrooke, 3001, 12e Avenue Nord, Sherbrooke, Quebec, Canada, J1H 5N4. E-mail address: [labpdj@usherbrooke.ca](mailto:labpdj@usherbrooke.ca)

### 12.6.1 Abstract

Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is a mouse model that reproduces cardinal signs of clinical, histopathological and immunological features found in multiple sclerosis (MS). Mast cells have been suggested to be involved in the main inflammatory phases occurring during EAE development, possibly by secreting several autacoids and proteases. Among the latter, the chymase mouse mast cell protease 4 (mMCP-4) can contribute to the inflammatory response by producing endothelin-1 (ET-1). The aim of this study was to determine the impact of mMCP-4 on acute inflammatory stages in EAE. C57BL/6 wild type (WT) or mMCP-4 knockout (KO) mice were immunized with MOG<sub>35-55</sub> plus complete Freund's adjuvant followed by pertussis toxin. Immunized WT mice presented an initial acute phase characterized by progressive increases in clinical score, which were significantly reduced in mMCP-4 KO mice. In addition, higher levels of spinal myelin were found in mMCP-4 KO as compared with WT mice. Finally, whereas EAE triggered significant increases in brain levels of mMCP-4 mRNA and immunoreactive ET-1 in WT mice, the latter peptide was reduced to basal levels in mMCP-4 KO congeners. Together, the present study supports a role for mMCP-4 in the early inflammatory phases of the disease in a mouse model of MS.

### 12.6.2 Introduction

Mast cells are integrally involved in cellular based immune responses to pathogens as well as inflammatory reactions prompted by pathogens or toxins [1, 2] and have been suggested for several years to play a part in the acute phase of Multiple Sclerosis (MS) [3-8]. Although the mechanisms by which mast cells influence MS are yet to be fully understood, trypsin-like proteases released from degranulating mast cells have been shown to trigger demyelination in a mouse model for MS- experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) [9]. Data from Secor *et al* (2000) furthermore, support that mast cells are involved in the pathogenesis of EAE [3]. The same group has more recently suggested a significant role for mast cells in activation of inflammasomes localized within meninges [10]. In contrast, other groups have challenged the contribution of mast cells in EAE [11-13]. In particular, Feyerabend and colleagues, showing that the complete ablation of MCs in a “Kit independent” MC-deficient strain, does not affect EAE development [12]. Although targeting mast cells as a viable approach to alleviate the disease remains debatable; the contribution of mast cell derived proteases in EAE is still largely uninvestigated. One of the many mast cell-expressed proteases that potentially may account for the contribution of mast cells to MS/EAE is mouse mast cell protease 4 (mMCP-4), a  $\beta$ -chymase predicted to be the murine functional counterpart to the single human chymase (CMA1) based on deduced amino acid sequence, tissue localization and serglycin storage dependence [14, 15]. In support for a role of this chymase in mast cell-dependent inflammatory conditions, mMCP-4 plays a protective role in a mouse model of mechanically induced cerebral trauma [16], yet is detrimental in lung inflammation and immune complex-induced glomerulonephritis [17, 18]. In further support for a role of mMCP-4 in regulating inflammatory events, we have shown that mMCP-4 generates endothelin-1 (ET-1) from its precursor big-ET-1 [19, 20], and that mMCP-4 knockout (KO) mice display a 40% reduction in pulmonary ET-1 levels when compared to wild type (WT) congeners [19].

The role of ET-1 as a marker in the etiology of MS has only been explored in a limited fashion. Haufschild *et al* (2001) reported a significant increase in ET-1 plasma levels in untreated MS patients [21], an observation confirmed by Pache and colleagues (2003) [22].

In treated MS patients though, such increases were not found [23]. However, in further support for a role of ET-1 in MS, ET-1 was shown to be overexpressed in a mouse model for MS (i.e. EAE) [24].

Based on the suggested links between ET-1 and MS and between chymase and ET-1 generation, respectively, we here asked whether chymase might have a role in EAE and whether chymase in this setting may have a regulatory effect on ET-1. Indeed, the findings presented here suggest that mMCP-4 has a significant detrimental impact on the course of EAE and plays a role in the generation of ET-1 in this setting. The impact of mMCP-4 in EAE introduces a potential role for mast cell chymase in MS and thereby identifies the inhibitors of this particular enzyme as potential targets for therapy of MS.

### 12.6.3 Material and methods

#### 12.6.3.1 Mice

C57BL/6 mice (i.e. wild type (WT)) were purchased from Charles River Canada (Montréal, QC, Canada) and housed in our local facility. mMCP-4 KO mice genitors were provided by Dr Gunnar Pejler (Uppsala University, Sweden) and were bred in our facility. The mMCP-4 KO mice have been backcrossed for over 10 generations with C57BL/6 congeners and are therefore highly congenial with the later strain [25]. Finally, the genotype of mMCP-4 KO mice used in the present study was confirmed by polymerase chain reaction (PCR) (as shown in supplementary Figure 1) via the use of primers described in Supplemental Table 1. We had previously reported, in mMCP-4 KO mice *in vivo* as well as in tissues or mastocytes derived from this mouse strain, the complete loss of chymase-dependent hydrolytic activity [19, 20].

All animals were kept at constant room temperature (23°C) and humidity (78%) under a controlled 10-14h light/dark cycle. Mice had free access to standard chow and tap water *ad libitum*. Animal care and experimentation were approved by Ethics Committee on Animal Research of the Université de Sherbrooke in accordance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care.

#### 12.6.3.2 Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)

Induction of EAE was performed according to the protocol of Miller *et al* (2007) [26]. In brief, a 1:1 emulsion mixture of myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG<sub>35-55</sub>) (Genemed Synthesis Inc., San Antonio, TX, USA) and complete Freund's Adjuvant (CFA) (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA) supplemented with 100 µg of heat-killed *Mycobacterium tuberculosis* H37RA (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) was prepared. Female mice, at 8-10 week-old, were subcutaneously injected in two sites (100 µl by site) adjacent to the tail with the emulsion. Pertussis toxin (200 ng) (List Biological Laboratories Inc., Campbell, CA, USA) was administered intraperitoneally on the same day of immunization. Mice were scored daily with the following scale to assess clinical scores: 0, no sign of clinical disease; 0.5, partial tail paralysis (loss of tip tail tonus); 1, tail flaccidity or

hind limb weakness; 2, limp tail and weakness in limb; 3, partial hind limb paralysis; 4, total hind limb paralysis; and 5, moribund state or death.

#### *12.6.3.3 Histopathology*

The immunized mice were anesthetized by intraperitoneal injection of 2,2,2-tribromomethanol (Avertin) (approximately 240 mg/kg) (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA), prepared in tert-amyl alcohol and diluted in 0,9% saline solution. The mice were then perfused with ice-cold PBS buffer (Wisent, St-Bruno, QC, Canada), and the spleen, cervical and thoracic spinal cords and left and right brain hemispheres were collected and stored at -80°C immediately whereas lumbar spinal cord were placed in 10% buffered formalin phosphate (Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) before being embedded in paraffin and cut into 5 µm sections.

#### *12.6.3.4 Histology stains*

Slides were deparaffinised in xylene (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) and hydrated in 100, 95, 70 % ethanol gradient following by water.

##### *12.6.3.4.1 Toluidine blue (mast cells)*

The slides were incubated 2-3 minutes at room temperature in toluidine blue (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA) working solution prepared by dilution of stock solution (1 % in ethanol 70%) in sodium chloride 1% pH 2-2.5. The slides were rinsed in water and quickly dehydrated in 95-100 % ethanol before being rinsed with xylene and cover slipped with Permount (Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada).

#### 12.6.3.4.2 *Luxol fast blue (myelin)*

Slides were incubated overnight at 56°C in 0.1% luxol fast blue solution (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) in 95% alcohol w/ acetic acid. The slides were then rinsed in distilled water before being differentiated in lithium carbonate 0.05% and in 70% ethanol for approximately 30 seconds each, since the grey matter is clear and white matter sharply defined. The slides were rinsed in water and dehydrated in 100% ethanol before being cleared in xylene and coverslipped with Permount.

All histological slides were scanned with NanoZoomer 2.0-RS Digital slide scanner (Hamamatsu Photonics, Shizuoka, Japan) before being treated with NDP.view2 Viewing software and paint.net software and staining density have been quantified by ImageJ 1.49V (Wayne Rasband, NIH, USA).

#### 12.6.3.4.3 *Immunofluorescence for Iba1 (microglia) and GFAP (astrocytes)*

Before measuring immunofluorescence, with a Sequence Slide Rack and Coverplate System (Ted Pell Inc, Redding, CA, USA), an antigen unmasking was performed by 10 minutes of incubation in 10 mM sodium citrate buffer pH 6.0 (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA) at a sub-boiling temperature. The slides were then washed in 0.1% Triton X-100 in PBS solution and blocked in 5% fetal bovine serum (FBS) supplemented with 0.1% Triton X-100 in PBS for one hour before being incubated overnight at 4°C with primary antibody (1:1000), against the rabbit anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP) (Cedarlane, Burlington, ON, Canada) or against the rabbit anti-ionized calcium binding adaptor molecule 1 (Iba1) (Wako, Osaka, Japan). A 2 hours incubation at room temperature with the secondary antibody (1:2000), Alexa Fluor 488 AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA, USA), was then performed. The slides were mounted with DAPI Fluoromount-G (SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA) and photomicrograph pictures were taken with Retiga SRV Mono Cooled numerical camera attached to Zeiss Axioskop 2 Microscope. The pictures were stitched with Adobe Photoshop CS3, and stain density was quantified with Image-Pro Plus 5.1 (Media Cybernetics Inc., Rockville, MD, USA).

#### *12.6.3.5 Measurement of endogenous brain ET-1 levels*

The left part of the brain from healthy or EAE 1, 2 or 3 weeks mice was homogenized in a chloroform : methanol (1:4) solution and then purified on a DSC-18 solid phase extraction column (Supelco, Bellefonte, PA, USA) and eluted in acetonitrile : water : trifluoroacetic acid (ACN 60% : H<sub>2</sub>O 40% : TFA 0,1%). The collected eluates were then Speed Vac-dried overnight before reconstitution in PBS supplemented of 1/32 mouse plasma and endogenous ET-1 was measured by Quantikine ELISA kit from R&D systems (R&D systems, Minneapolis, MN, USA) according to the manufacturer's instructions.

#### *12.6.3.6 Measurement of spinal cord endogenous Interferon-gamma (IFN $\gamma$ ) levels*

Tissue lysates were prepared as described previously [27]. Briefly, frozen thoracic spinal cords were weighed and homogenized in 0.5 mL of ice-cold lysis buffer (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) supplemented with protease inhibitors (Roche Diagnosis, Mannheim, Germany) by rapid agitation for 2 minutes in the presence of 3 mm stainless beads. The tissue lysate was centrifuged for 20 minutes at 13,000 g at 4°C, and the supernatant was transferred to a new tube. The tissue levels of IFN $\gamma$  were determined using murine ELISA development kits (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA), according to the manufacturer's instruction. The level of IFN $\gamma$  was reported as pg/mg of tissue.

#### *12.6.3.7 RNA extraction and quantitative RT-PCR*

RNA from the right brain hemisphere derived from healthy or EAE 1 or 2 weeks mice were extracted using RiboZol<sup>TM</sup> reagent (Amresco inc., Solon, OH, USA). Tissues were homogenized with glass-Teflon homogenizer. Chloroform (200  $\mu$ l) (J.T. Baker, Central Valley, PA, USA) was added to each tube per 1 mL of RiboZol and incubated at room temperature for 3 minutes followed by centrifugation at 12,000 g for 15 minutes at 4°C. Non-opaque supernatants were collected and 500  $\mu$ l of isopropanol (Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada) was added for RNA precipitation and incubated 10 minutes at room temperature followed by centrifugation at 12,000 g for 10 minutes at 4°C. Pellets were



washed with addition of 1 ml ethanol 75% followed by 7,500 g centrifugation at 4°C for 5 minutes before being re-dissolved in 50 µl of DEPC water and incubated at 55°C for 10 minutes. RNA concentration was determined by absorbance at A<sub>260</sub> and purity by ratio A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>. 1 µg of RNA was then used for remaining experiments. cDNA was synthesized using oligo(dT)<sub>12-18</sub> primers (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), dNTPs mix 10 µM each (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), in SuperScript III buffer with DTT, RNaseOUT and SuperScript III (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Quantitative PCR was performed for actin and mMCP-4 by monitoring in real time the fluorescence increase of the SYBR Green in the Perfecta SYBR Green SuperMix, low ROX (Quanta Biosciences, Gaithersburg, MD, USA) using the MX3000P Multiplex Quantitative PCR System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Primers (IDT, Coralville, IA, USA) were used at final concentration of 50 nM per primer and sequences were designed as follows:

mMCP-4 F : 5'- CTCTCTCCAAGCTGTGACCGAC -3'

mMCP-4 R : 5'- CTATGAGCTCCAAGGGTGACA -3'

β-actin F : 5'- GATCAAGATCATTGCTCCTCCTGAGC -3'

β-actin R : 5'- GCAGCTCAGTAACAGTCCGCCTAG -3'

mMCP-4 KO mice samples were tested as negative controls. As β-actin levels were stable between healthy and immunized mice, the latter mRNA was used as internal control for normalization and relative expression of chymase mMCP-4 was calculated using the 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup> method.

#### 12.6.3.8 *Statistical analysis*

All data are presented as the mean ± SEM. All statistical analyses were conducted using GraphPad Prism 6 software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Statistical significance was reached when the “P” value was below 0.05 and determined using one-way ANOVA Kruskal-Wallis followed by Bonferroni for EAE clinical score or based on one-way or two-way ANOVA and multiple Student’s t test for all other analysis.

## 12.6.4 Results

### **12.6.4.1 Reduced impact of EAE in mMCP-4 KO mice when compared to WT congeners.**

An emulsified mixture of MOG<sub>35-55</sub> in CFA was subcutaneously injected in WT or mMCP-4 KO mice. WT mice developed the disease approximately after 9 days whereas the mMCP-4 KO mice demonstrated a substantial delay in the appearance of clinical symptoms, being detectable starting from ~day 12 post injection (Figure 1a). Moreover, the development of severe disease (disease score 2.5) was markedly delayed in mMCP-4 KO mice up until the third week post-treatment as indicative of tail and back limb weaknesses. However, 4 weeks post-EAE, WT and mMCP-4 KO mice exhibited similar disease scores with no evidence of total hind limb paralysis. A summation of the total clinical scores on the other hand, supported a significant role of mMCP-4 as a pathogenic factor in EAE (Figure 1b), even up to the 4th week of observations (WT  $41.64 \pm 3.02$ ; mMCP-4 KO  $30.93 \pm 2.48$ ,  $p < 0.05$ ,  $n = 7$  mice).

To assess, on the other hand, whether mMCP-4 has an impact on the immune response, spleen weights of WT and mMCP-4 KO mice were monitored up to 4 weeks post immunization. However, as seen in Figure 2, spleen weights did not differ between the two genotypes except in healthy mice where it was significantly increased in mMCP-4 KO congeners ( $p < 0.05$ ).

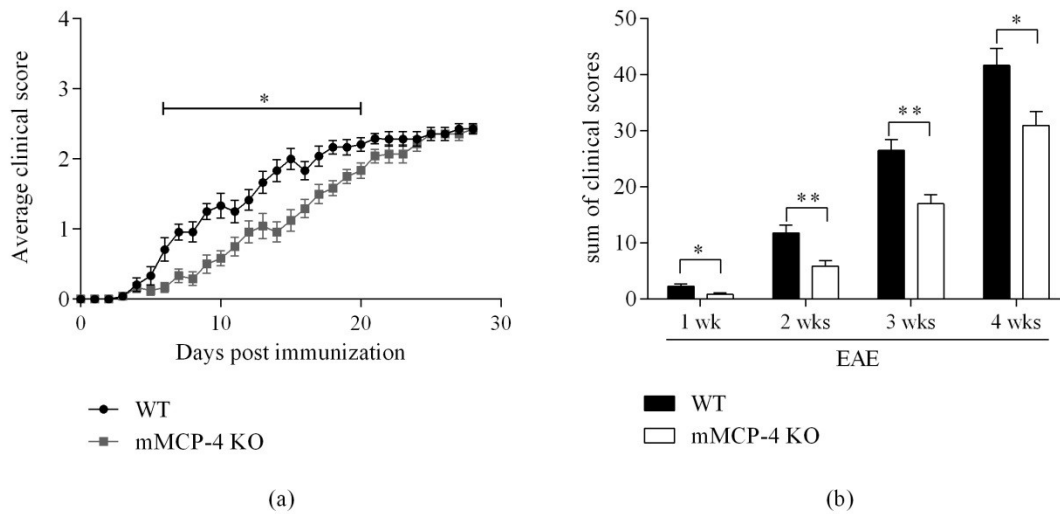


Figure 17 : Figure 1 de Desbiens *et al.* (2016).

Figure 1: Delayed development of EAE symptoms without change in the severity of the disease in mMCP-4 KO mice. A) Clinical score of WT (•) or mMCP-4 KO (▪) mice B) Sum of clinical score at different set points after immunization of WT (closed bars) and mMCP-4 KO (opened bars) mice. Each point or bar represents the mean  $\pm$  SEM of 12 (weeks 1 to 3) and 7 mice (4th week). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

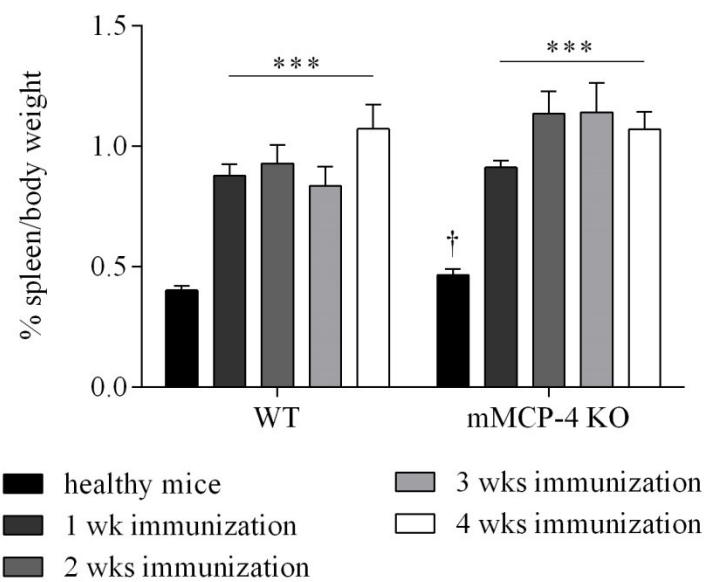


Figure 18 : Figure 2 de Desbiens *et al.* (2016).

Figure 2: Induction with MOG/CFA induced an increase of spleen weight compared to healthy mice. Each bar represents the mean  $\pm$  SEM of 6 to 15 mice. \*\*\*  $p < 0.001$  vs healthy WT or healthy mMCP-4 KO mice or †  $p < 0.05$  comparing WT vs KO mice at each time point studied.

#### **12.6.4.2 mMCP-4 KO mice demonstrate lower percentage of reactive gliosis after EAE.**

In response to spinal cord insults, GFAP (an intermediate filament protein expressed by astrocytes and ependymal cells among others) is upregulated in the CNS [28]. As another sign of CNS damage, the reactive microglial response can be measured by the extent of upregulation of Iba1 [29]. To evaluate whether mMCP-4 can influence the levels of these markers of CNS damage, the spinal cords of 2 weeks post-EAE immunized mice were extracted and stained for GFAP and Iba1 (Figure 3a). mMCP-4 KO mice and WT littermates showed no significant differences in percent level of astrogliosis (GFAP staining intensity) and microgliosis (Iba1 staining intensity) in the total area of the lumbar spinal cord or in the white matter (Figure 3b). In contrast, significant reductions in percentages of microgliosis and astrogliosis were found in the grey matter of mMCP-4 KO mice when compared to WT congeners, 2 weeks post-EAE immunization (in WT and mMCP-4 KO mice respectively; astrogliosis in percentage:  $0.87 \pm 0.17$  and  $0.30 \pm 0.04$ ,  $p < 0.05$ ; microgliosis in percentage:  $1.61 \pm 0.18$  and  $0.55 \pm 0.12$ ,  $p < 0.01$ ) (Figure 3b).

To assess whether the absence of mMCP-4 has an influence on the number of mast cells, lumbar spinal cords from WT and mMCP-4 KO mice were stained with toluidine blue, both at baseline and after induction of EAE. As seen in Figure 4, the numbers of mast cells were similar in spinal cords from WT and mMCP-4 KO mice at the baseline state (healthy) and 2-3 weeks after induction of EAE. Notably though, there was a significant elevation of the numbers of mast cells 1 week post-EAE (in WT and mMCP-4 KO mice respectively; in percentage, healthy state:  $2.30 \pm 0.07$  and  $2.47 \pm 0.17$ , 1 week after EAE:  $2.93 \pm 0.14$  and  $3.74 \pm 0.27$ ,  $p < 0.05$ , 2 weeks after EAE:  $2.73 \pm 0.25$  and  $2.93 \pm 0.20$ , 3 weeks after EAE:  $3.20 \pm 0.13$  and  $3.29 \pm 0.17$ ).

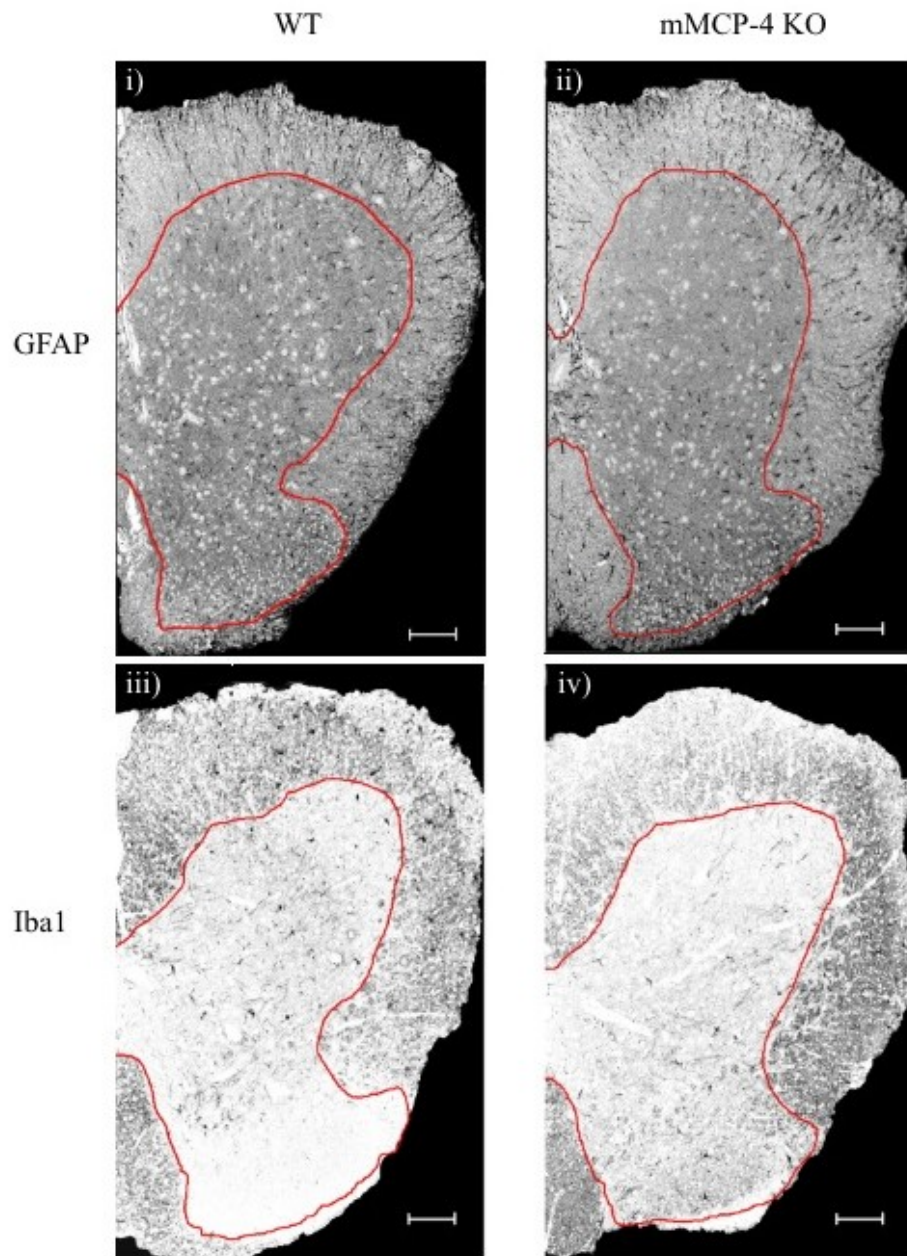


Figure 19 : Figure 3a de Desbiens *et al.* (2016).

Figure 3a: Photomicrograph of the spinal cords stained with GFAP or Iba1. White and grey matters are delimited by the red line. Scale bar is 200  $\mu$ m. Upper panels: GFAP marking in i) WT mice, 2 weeks post-EAE, or ii) mMCP-4 KO mice, 2 weeks post-EAE. Lower panel: Iba1 staining in iii) WT mice, 2 weeks post-EAE, or iv) mMCP-4 KO mice, 2 weeks post-EAE.

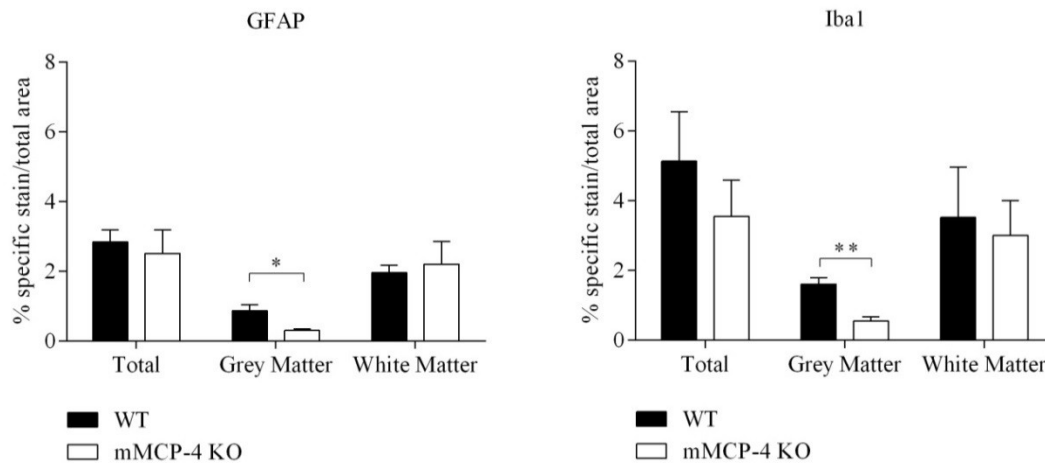


Figure 20 : Figure 3b de Desbiens *et al.* (2016).

Figure 3b: Grey matter levels of microglia and astrocytes are decreased in mMCP-4 KO mice 2 weeks after EAE. Left panel, percentage of astrocytes in 2 weeks EAE mice; right panel, percentage of microglia 2 weeks after EAE. \*  $p < 0.05$  or \*\*  $p < 0.01$  for EAE-induced WT versus EAE-induced mMCP-4 KO mice. Each bar represents the mean  $\pm$  SEM in 4 mice, in duplicates.

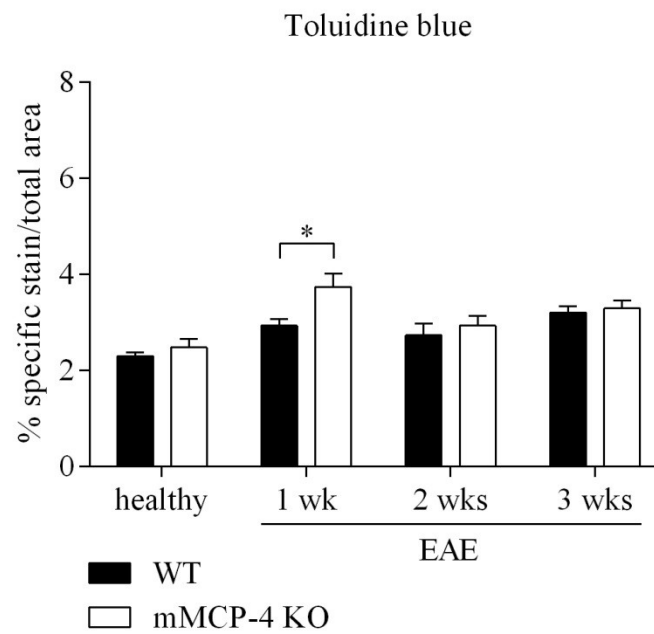


Figure 21 : Figure 4 de Desbiens et al. (2016).

Figure 4: Mast cells density is increased in mMCP-4 KO mice on the first week post-EAE only. Results are presented as the mean  $\pm$  SEM of specific toluidine blue stained in white matter area. Each spinal cord was quantified in duplicates or triplicates for  $n = 4$  mice. \*  $p < 0.05$  vs WT mice EAE immunized.



#### **12.6.4.3 mMCP-4 KO mice show higher levels of spinal cord myelin.**

To assess whether chymase has an impact on the levels of intact myelin, lumbar spinal cords from WT and mMCP-4 KO mice were extracted and stained with luxol fast blue, a dye that stains myelin (Figure 5). Quantification of the luxol fast blue staining intensity revealed a significantly higher myelin content in mMCP-4 KO mice as compared with WT congeners, both in non-immunized (healthy) mice and immunized mice 1 week post-EAE induction (Figure 6) (in percentage, healthy WT mice:  $31.62 \pm 0.46$  and healthy mMCP-4 KO mice:  $39.70 \pm 1.03$ ,  $p < 0.001$ ; WT 1 week after EAE:  $27.37 \pm 0.29$  and mMCP-4 KO mice 1 week after EAE:  $33.88 \pm 0.50$ ,  $p < 0.001$ ). A subsequent decline in spinal cord myelin was seen in both WT and mMCP-4 KO mice 2 to 3 weeks post-immunization as well as a loss of significant differences in myelin content between the two strains of mice (Figure 6).

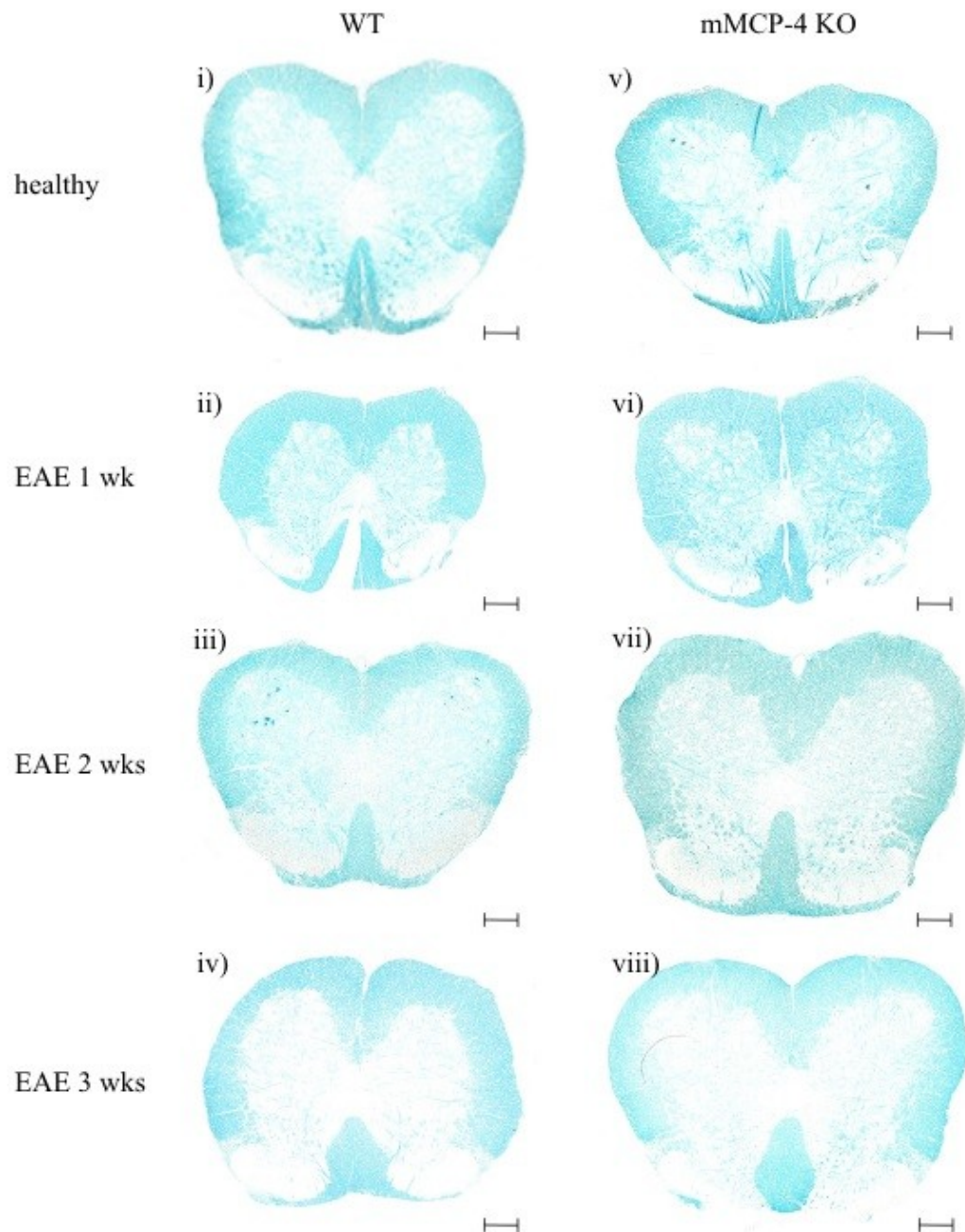


Figure 22 : Figure 5 de Desbiens *et al.* (2016).

Figure 5: Photomicrograph of the spinal cords stained for assessment of myelin integrity with luxol fast blue. Scale bar is 200  $\mu$ m. Left hand column: i) WT mice, healthy, or ii) 1 week post-EAE, iii) 2 weeks post-EAE, iv) 3 weeks post-EAE; right hand column, v) mMCP-4 KO mice, healthy, or vi) 1 week post-EAE, vii) 2 weeks post-EAE, viii) 3 weeks post-EAE.

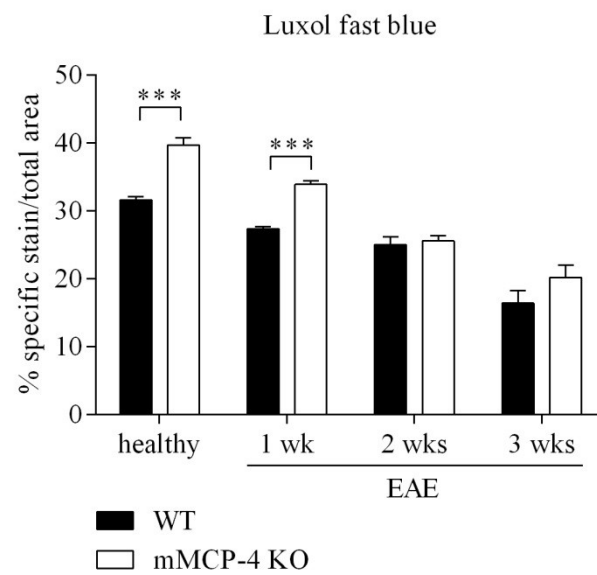


Figure 23 : Figure 6 de Desbiens *et al.* (2016).

Figure 6: Myelin lost during the progression of EAE disease in healthy or 1, 2 or 3 weeks after EAE in WT mice (closed bars) and mMCP-4 KO mice (opened bars). Results are shown as the mean  $\pm$  SEM of 4 mice quantified in duplicates or in triplicates. \*\*\*  $p < 0.01$ .

#### **12.6.4.4 EAE increases brain mMCP-4 mRNA and ET-1 levels in WT mice.**

To investigate if EAE is associated with an induction of the mMCP-4 gene, right brain homogenates derived from WT mice were analysed for mMCP-4 mRNA levels by qPCR. As seen in Figure 7a, a 2.2 fold increase in mMCP-4 mRNA expression (as compared with baseline levels in healthy mice) was found in WT mice one week post-EAE immunization but not at later time points. Finally, EAE immunization promoted a two fold increase in mature ET-1 levels in left brain homogenates of WT but not mMCP-4 KO mice, one but not two weeks post-EAE when compared to healthy WT mice (Figure 7b).

#### **12.6.4.5 EAE increases IFN $\gamma$ levels in thoracic spinal cords.**

To investigate the immune response to EAE induction, we proceeded to ELISA quantification of IFN $\gamma$  in thoracic spinal cord in healthy and 1 or 2 weeks after EAE. As show in Figure 7c, the levels of this cytokine is increased post-EAE compared to healthy basal levels in both strains of mice, but significantly only in WT mice 2 weeks after EAE (quantities in pg/mg of tissue, healthy WT mice:  $20.77 \pm 1.84$ ; WT 1 week after EAE:  $23.30 \pm 2.11$ ; WT 2 weeks after EAE:  $32.07 \pm 2.11$ ,  $p < 0.001$  and healthy mMCP-4 KO mice:  $19.23 \pm 1.65$ ; mMCP-4 KO mice 1 week after EAE:  $24.66 \pm 4.24$ ; mMCP-4 KO mice 2 weeks after EAE:  $26.47 \pm 3.39$ ).

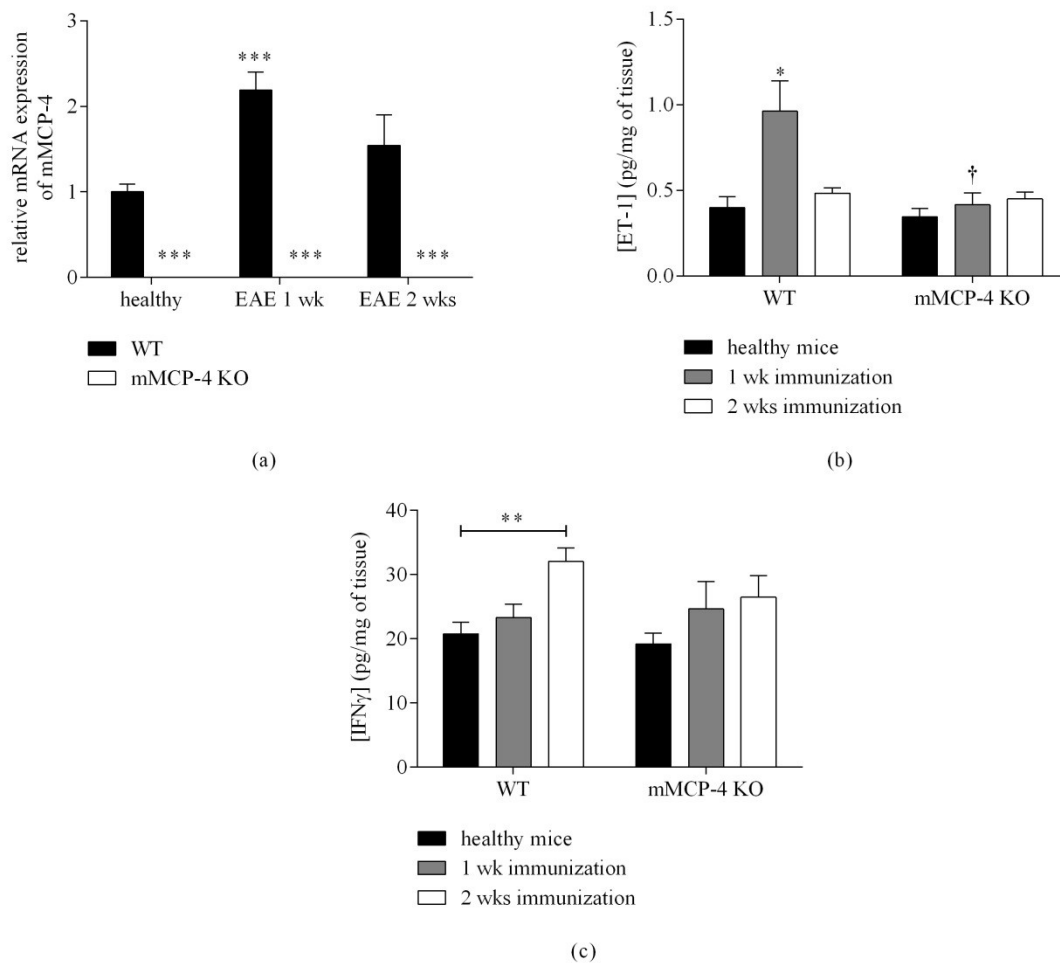


Figure 24 : Figure 7 de Desbiens *et al.* (2016).

Figure 7: mMCP-4 brain mRNA expression is increased 1 week after EAE and is correlated with increased of ET-1 brain levels whereas IFN $\gamma$  is enhanced 2 weeks after EAE in spinal cord of WT but not mMCP-4 KO mice. A) mRNA relative expression of mMCP-4 in healthy or 1 or 2 weeks after EAE quantified in WT (closed bars) and in mMCP-4 KO (opened bars) mice. B) ET-1 levels of healthy (closed bars), 1 week (grey shaded bars) or 2 weeks after EAE (opened bars) in WT and mMCP-4 KO mice. C) IFN $\gamma$  levels of healthy (closed bars), 1 week (grey shaded bars) or 2 weeks after EAE (opened bars) in WT and mMCP-4 KO mice. Each bar represents the mean  $\pm$  SEM of 4 to 8 mice. \* p < 0.05; \*\* p < 0.001; \*\*\* p < 0.001 or † p < 0.05 comparing WT vs KO mice at each time point studied.

### 12.6.5 Discussion

The main results of the present study are that mMCP-4 KO mice subjected to EAE show a reduced clinical score as well as brain levels of immunoreactive ET-1 when compared to WT congeners. In addition, the KO mice show reduction in percentages of microgliosis and astrogliosis and grey matter alterations.

These results therefore support our hypothesis that this particular chymase isoform plays a significant role in the early development of MS in the mouse EAE model. In our hands, the KO of mMCP-4 significantly reduced clinical scores up until 21 days post-EAE induction. It is noteworthy that mature mast cells can express numerous tryptases (having trypsin-like cleavage specificity) and chymases (having chymotrypsin-like cleavage specificities) as well as other types of proteases [30]. Out of these, mMCP-4 was shown here to have a major impact on the course of EAE development. This suggests that mMCP-4 accounts to a major extent for the demyelination attributed to mast cells in EAE. This does not exclude, on the other hand, the involvement of other mast cell-derived mediators in this mouse model of MS. It is also of interest that EAE prompted a significant increase in ET-1 brain levels one week post-EAE induction in WT but not in mMCP-4 KO mice. Notably, brain levels of this potent vasoactive peptide progressively returned to basal levels on the second and third week post-EAE (results not shown for the 3<sup>rd</sup> week). These results suggest that ET-1 may be either an early marker or, alternatively, an early mediator of the inflammatory reaction occurring in the EAE model. Interestingly, Shin *et al* (2001) reported that an ET<sub>A</sub> antagonist, BQ-123, reduced the duration of paralysis, in EAE-induced rats [31]. The same authors also reported high levels of immuno-reactive ET-1 in spinal cord-localized inflammatory and neuroglial cells [31]. These observations are of importance considering that Hammond *et al* (2014) have recently shown that ET-1 is a negative regulator of oligodendrocyte progenitor cell-dependent repair of demyelinated lesions [32]. In support of the latter hypothesis, myelin contents were in the present study found to be higher in naive and even one week post-EAE immunized mMCP-4 KO mice than in their WT congeners. Thus, interfering with the chymase-dependent production of ET-1 in MS may be a relevant therapeutic strategy in

autoimmune diseases such as MS [33]. Noteworthy, chymase inhibitors have been shown to possess anti-inflammatory and anti-proliferative properties in other settings [34-37].

Although still controversial, one should also note that the beneficial effects of ET-1 antagonists on cerebral blood flow of MS patients [38]. Thus ET-1 antagonists may have beneficiary effects not only by repressing cellular events in EAE but by improving overall brain blood circulation as well. Further studies currently ongoing in our laboratory should shed further light on the contribution of ET-1 via one ET<sub>A</sub> and/or ET<sub>B</sub> receptors and their associated mechanisms, in the etiology of EAE in the mouse model.

Although we have shown in the present study that mMCP-4 is detrimental in an experimental model of MS, the same concept cannot be extended to all types of experimental injuries of the CNS. For example, Hendrix and colleagues (2013) reported the protective role of mast cells (in part due to mMCP-4) in a mouse model of mechanically induced brain injury [16]. Noteworthy, in the same study the authors reversed the protective role of mMCP-4 with a general chymotrypsin inhibitor, chymostatin, which is non-specific for chymase-dependent processes [16]. It has been elegantly reported by Kerschensteiner *et al* (2004) that, in contrast to spinal cord injury models, EAE-induced lesions may facilitate additional levels of axonal reorganization based on the unlesioned fibers of the tract [39]. These observations support the concept that neuroinflammatory and surgical hemisections of the spinal cord, in the mouse model, alters in opposite fashion the ‘reserve capacity’ of the CNS to regenerate [39]. Thus, we suggest that immune-related inflammatory reactions and surgical trauma in the CNS prompts opposite roles for mMCP-4.

Interestingly, monitoring of IFN $\gamma$  in our model, suggests an enhanced inflammatory reaction in the spinal cord of WT but not mMCP-4 KO mice. We observed a significantly higher concentration of IFN $\gamma$  in the spinal cords of WT compared to mMCP-4 KO mice 2 weeks after immunization. The decreased inflammatory response is correlated with the observation that mMCP-4 KO mice have decreased proliferation of microglia and astrocytes. The exact mechanism of such decreases is unknown. It can be explained by decreased responses of CNS inflammatory cells in mMCP-4 KO mice which lead to the decreased concentration of pro-inflammatory molecules, decreased chemotactic gradient, decreased influx of Th1 cells, decreased IFN $\gamma$  and as a result, decreased demyelination. On the other hand, preserved

integrity of the BBB may lead to reduced influx of Th1 cells from the periphery, a decreased activation of astrocytes and microglia, a decreased overall inflammation in the CNS and a decreased demyelination. Based on the above observations, the present study reinforces the hypothesis suggested by Scanduzzi *et al* (2010), Reber *et al* (2014) and Magnusson *et al* (2009) [17, 18, 40] that mMCP-4 activates cells involved in tissue specific autoimmune reactions.

Overall we show in the present study that a single mouse chymase isoform, mMCP-4, contributes significantly to the etiology and early symptoms associated with a mouse model of MS, namely EAE. If what is reported here in the mouse model can be extended to the clinical situation, it is suggested that targeting chymase rather than the overall mastocytic activity in that particular autoimmune disease will constitute an added value within the currently available therapeutic arsenal against this neurodegenerative disease.



#### 12.6.6 Acknowledgements

This project was financially supported by the Canadian Institutes for Health Research (MOP-57883) as well as by the Etienne Lebel Clinical Research Center of the Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke. C.L. held a summer studentship from the Faculty of Medecine, Université de Sherbrooke. P.D.-J. is the recipient of a John E. Edwards Cardiology Chair. D.G. is a recipient of a Junior 2 scholarship from the Fonds de la Recherche Québec en Santé.

#### 12.6.7 Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this manuscript.

### 12.6.8 References

1. L. Frenzel and O. Hermine, "Mast cells and inflammation", *Joint Bone Spine*, vol. 80, no. 2, pp. 141-145, 2013
2. A. L. St John and S. N. Abraham, "Innate immunity and its regulation by mast cells", *Journal of Immunology*, vol. 190, no. 9, pp. 4458-4463, 2013
3. V. H. Secor, W. E. Secor, C. A. Gutekunst et al., "Mast cells are essential for early onset and severe disease in a murine model of multiple sclerosis", *The Journal of experimental medicine*, vol. 191, no. 5, pp. 813-822, 2000
4. B. A. Sayed, M. E. Walker and M. A. Brown, "Cutting edge: mast cells regulate disease severity in a relapsing-remitting model of multiple sclerosis", *Journal of Immunology*, vol. 186, no. 6, pp. 3294-3298, 2011
5. G. D. Gregory, M. Robbie-Ryan, V. H. Secor et al., "Mast cells are required for optimal autoreactive T cell responses in a murine model of multiple sclerosis", *European journal of immunology*, vol. 35, no. 12, pp. 3478-3486, 2005
6. M. Costanza, M. P. Colombo and R. Pedotti, "Mast cells in the pathogenesis of multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis", *International journal of molecular sciences*, vol. 13, no. 11, pp. 15107-15125, 2012
7. A. L. Christy, M. E. Walker, M. J. Hessner et al., "Mast cell activation and neutrophil recruitment promotes early and robust inflammation in the meninges in EAE", *Journal of autoimmunity*, vol. 42, no. pp. 50-61, 2013
8. M. A. Brown, M. B. Tanzola and M. Robbie-Ryan, "Mechanisms underlying mast cell influence on EAE disease course", *Molecular Immunology*, vol. 38, no. 16-18, pp. 1373-1378, 2002
9. S. L. Watson, K. Westland and J. D. Pollard, "An electrophysiological and histological study of trypsin induced demyelination", *Journal of the neurological sciences*, vol. 126, no. 2, pp. 116-125, 1994
10. A. E. Russi, M. E. Walker-Caulfield and M. A. Brown, "Mast cell inflammasome activity in the meninges regulates EAE disease severity", *Clinical immunology*, vol. no. pp. 2016

11. S. Piconese, M. Costanze, S. Musio et al., "Exacerbated experimental autoimmune encephalomyelitis in mast-cell-deficient Kit W-sh/W-sh mice", *Laboratory investigation*, vol. 91, no. 4, pp. 627-641, 2011
12. T. B. Feyerabend, A. Weiser, A. Tietz et al., "Cre-mediated cell ablation contests mast cell contribution in models of antibody- and T cell mediated autoimmunity", *Immunity*, vol. 35, no. 5, pp. 832-844, 2011
13. J. L. Bennet, M. R. Blanchet, L. Zhao et al., "Bone marrow-derived mast cells accumulate in the central nervous system during inflammation but are dispensable for experimental autoimmune encephalomyelitis pathogenesis", *The Journal of immunology*, vol. 182, no. 9. Pp. 5507-5514, 2009
14. Q. Wu, H. C. Kuo and G. G. Deng, "Serine proteases and cardiac function", *Biochimica Biophysica Acta*, vol. 1751, no. 1, pp. 82-94, 2005
15. M. K. Andersson, U. Karlson and L. Hellman, "The extended cleavage specificity of the rodent beta-chymases rMCP-1 and mMCP-4 reveal major functional similarities to the human mast cell chymase", *Molecular Immunology*, vol. 45, no. 3, pp. 766-775, 2008
16. S. Hendrix, P. Krmaer, D. Pehl et al., "Mast cells protect from post-traumatic brain inflammation by the mast cell-specific chymase mouse mast cell protease-4", *FASEB Journal*, vol. 27, no. 3, pp. 920-929, 2013
17. L. Scanduzzi, W. Beghdadi, E. Daugas et al., "Mouse mast cell protease-4 deteriorates renal function by contributing to inflammation and fibrosis in immune complex-mediated glomerulonephritis", *Journal of Immunology*, vol. 185, no. 1, pp. 624-633, 2010
18. L. L. Reber, F. Daubeuf, G. Pejler et al., "Mast cells contribute to bleomycin-induced lung inflammation and injury in mice through a chymase/mast cell protease 4-dependent mechanism", *Journal of Immunology*, vol. 192, no. 4, pp. 1847-1854, 2014
19. M. Houde, M. D. Jamain, J. Labonte et al., "Pivotal role of mouse mast cell protease 4 in the conversion and pressor properties of Big-endothelin-1", *The Journal of Pharmacology and experimental therapeutics*, vol. 346, no. 1, pp. 31-37, 2013
20. W. Semaan, L. Desbiens, M. Houde et al., "Chymase inhibitor-sensitive synthesis of endothelin-1 (1-31) by recombinant mouse mast cell protease 4 and human chymase", *Biochemical pharmacology*, vol. 94, no. 2, pp. 91-100, 2015

21. T. Haufschild, S. G. Shaw, J. Kesselring et al., "Increased endothelin-1 plasma levels in patients with multiple sclerosis", *J Neuroophthalmol*, vol. 21, no. 1, pp. 37-38, 2001
22. M. Pache, H. J. Kaiser, N. Akhalbedashvili et al., "Extraocular blood flow and endothelin-1 plasma levels in patients with multiple sclerosis", *European neurology*, vol. 49, no. 3, pp. 164-168, 2003
23. I. Jankowska-Lech, B. Terelak-Borys, I. Grabska-Liberek et al., "Decreased endothelin-1 plasma levels in multiple sclerosis patients: a possible factor of vascular dysregulation?", *Medical science monitor*, vol. 121, no. pp. 1066-1071, 2015
24. Y. Guo, S. K. Chung, C. W. Siu et al., "Endothelin-1 overexpression exacerbate experimental allergic encephalomyelitis", *Journal of neuroimmunology*, vol. 276, no. 1-2, pp. 64-70, 2014
25. E. Tchougounova, G. Pejler and M. Abrink, "The chymase, mouse mast cell protease 4, constitutes the major chymotrypsin-like activity in peritoneum and ear tissue. A role for mouse mast cell protease 4 in thrombin regulation and fibronectin turnover", *The Journal of experimental medicine*, vol. 198, no. 3, pp. 423-431, 2003
26. S. D. Miller and W. J. Karpus, "Experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse", *Current protocol of immunology*, vol. Chapter 15, no. pp. Unit 15 11, 2007
27. M. Gharagozloo, T. M. Mahvelati, E. Imbeault et al., "The nod-like receptor, Nlrp12, plays an anti-inflammatory role in experimental autoimmune encephalomyelitis", *Journal of neuroinflammation*, vol. 12, no. pp. 198, 2015
28. S. Brahmachari, Y. K. Fung and K. Pahan, "Induction of glial fibrillary acidic protein expression in astrocytes by nitric oxide", *The journal of Neuroscience*, vol. 26, no. 18, pp. 4930-4939, 2006
29. K. Ohsawa, Y. Imai, Y. Sasaki et al., "Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbrin and enhances its actin-bundling activity", *Journal of neurochemistry*, vol. 88, no. 4, pp. 844-856, 2004
30. S. Wenersson and G. Pejler, "Mast cell secretory granules: armed for battle", *Nature Reviews. Immunology*, vol. 14, no. 7, pp. 478-494, 2014
31. T. Shin, B. Kang, N. Tanuma et al., "Intrathecal administration of endothelin-1 receptor antagonist ameliorates autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats", *Neuroreport*, vol. 12, no. 7, pp. 1465-1468, 2001

32. T. R. Hammond, A. Gadea, J. Dupree et al., "Astrocyte-derived endothelin-1 inhibits remyelination through notch activation", *Neuron*, vol. 81, no. 3, pp. 588-602, 2014
33. M. E. Walker, J. K. Hatfield and M. A. Brown, "New insights into the role of mast cells in autoimmunity: evidence for a common mechanism of action? ", *Biochimica Biophysica Acta*, vol. 1822, no. 1, pp. 57-65, 2012
34. S. Heuston and N. O. Hyland, "Chymase inhibition as a pharmacological target: a role in inflammatory and functional gastrointestinal disorders?", *British journal of pharmacology*, vol. 167, no. 4, pp. 732-740, 2012
35. B. E. Maryanoff, L. de Garavilla, M. N. Greco et al., "Dual inhibition of cathepsin G and chymase is effective in animal models of pulmonary inflammation", *American journal of respiratory and critical care medicine*, vol. 181, no. 3, pp. 247-253, 2010
36. S. Oyamada, C. Bianchi, S. Takai et al., "Chymase inhibition reduces infarction and matrix metalloproteinase-9 activation and attenuates inflammation and fibrosis after acute myocardial ischemia/reperfusion", *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, vol. 339, no. 1, pp. 141-151, 2011
37. S. S. Palaniyandi, Y. Nagai, K. Watanabe et al., "Chymase inhibition reduces the progression to heart failure after autoimmune myocarditis in rats", *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)*, vol. 232, no. 9, pp. 1213-1221, 2007
38. M. D'Haeseleer, R. Beelen, Y. Fierens et al., "Cerebral hypoperfusion in multiple sclerosis is reversible and mediated by endothelin-1", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, vol. 110, no. 14, pp. 5654-5658, 2013
39. M. Kerschensteiner, F. M. Bareyre, B. S. Buddeberg et al., "Remodeling of axonal connections contributes to recovery in an animal model of multiple sclerosis", *The Journal of experimental medicine*, vol. 200, no. 8, pp. 1027-1038, 2004
40. S. E. Magnusson, G. Pejler, S. Kleinau et al., "Mast cell chymase contributes to the antibody response and the severity of autoimmune arthritis", *FASEB Journal*, vol. 23, no. 3, pp. 875-882, 2009

### 12.6.9 Supplements

#### 12.6.9.1 Supplementary Methods

##### *DNA extraction and genotyping*

The end tip of the tail of WT and mMCP-4 KO mice was collected and the DNA was isolated and purified using the E.Z.N.A Tissue DNA Kit (Omega Bio-Tek Inc, Norcross, GA, USA) according to the manufacturer's instructions. The genotype of the mice was then confirmed by PCR using increasing annealing temperatures in the following protocol: an initial denaturation for 2 min at 95°C, followed by 40 cycles of denaturation for 2 min at 95°C, annealing for 2 min 30 sec at 60 °C (+ 0.2 °C for each cycle), and extension for 6 min at 72°C, ending with a final 10 min at 72°C. The PCR contained 0.4 mM of dNTPs (Fermentas Canada Inc, Burlington, ON, Canada), 6 mM of MgCl<sub>2</sub>, 1 µM of each primer, 4 µl of the isolated DNA and 0.04 U/µl of recombinant Taq DNA polymerase (Life Technologies Inc, Grand Island, NY, USA) in Taq polymerase buffer 1X. The primers used are presented in Supplement Table 1. The final PCR products were migrated on a 2% agarose gel containing 200X SYBR Safe (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) for visualisation of the bands. WT alleles produce a 900 base pairs band while the KO alleles produce a fragment 380 bp.

## 12.6.9.2 Supplementary Table 1 and Figure 1

Tableau 2: Tableau supplémentaire 1 de Desbiens *et al.* (2016).

Supplementary Table 1: Amplification conditions corresponding to the mMCP-4 gene for mouse genotyping used in this study.

Products	Final Concentrations	Primers		Amplification conditions	Temperature
Water	--	5' – CAA GGT CCA ACT AAC TCC CTT TGT GCT CC – 3'	Forward : common	Denaturation	95°C
Buffer 10 X	1 X			Annealing	60°C+0.2°C/cycle
dNTPs (10 mM)	0.4 mM/dNTP	5' – GGT GAT CTC CAG ATG GGC CAT GTA AGG GCG – 3'	Reverse : WT gene	Étension	72°C
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	6 mM				
Primers (10 µM)	1 µM/primer				(Nb cycle = 40)
cDNA	--	5' – GGG CCA GCT CAT TCC TCC CAC TCA TGA TCT – 3'	Reverse : KO gene		
Taq pol. (1 U/µl)	0.04 U/µl				

Amplified fragment length : 900 bp for WT gene and 380 bp for mutated gene.



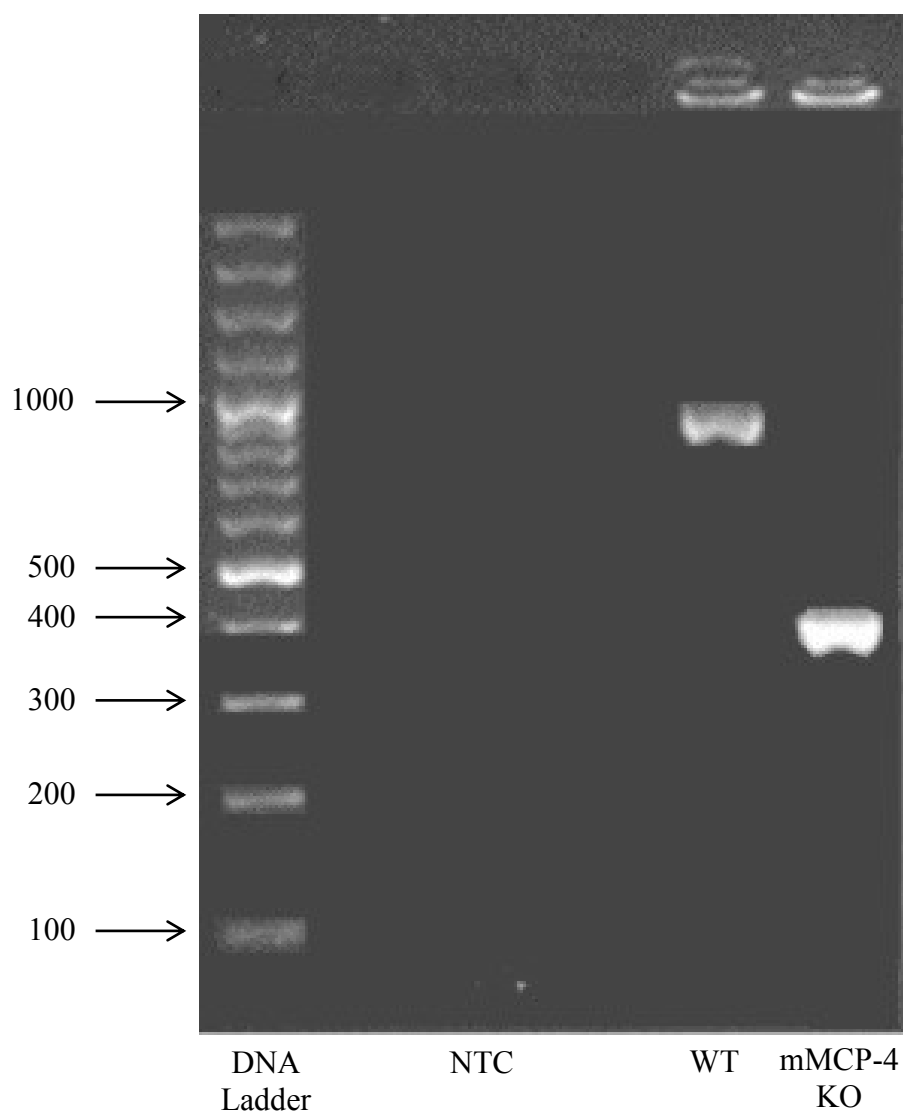


Figure 25 : Figure supplémentaire 1 de Desbiens *et al.* (2016).

Supplementary Figure 1: Genotyping of WT and mMCP-4 KO mice for the mMCP-4 gene. The bottom row indicates from which genotype the samples tested come from. The numbers at the left of the figure indicate the approximate size of double-stranded DNA on agarose gel. (NTC = no template control a negative control without DNA).

### **13. ARTICLE 2**

#### 13.1 Titre

**Experimental autoimmune encephalomyelitis potentiates mouse mast cell protease 4-dependent pressor responses to centrally or systemically administered big-endothelin-1**

#### 13.2 Auteurs de l'article

Louisane Desbiens, Louis Gendron, Marjan Gharagozloo, Catherine Lapointe, Laurence Vincent, Gunnar Pejler, Denis Gris, Pedro D'Orléans-Juste

#### 13.3 Statut de l'article

Soumis à *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, décembre 2018

#### 13.4 Avant-propos

Ma contribution dans ce manuscrit a été d'émettre l'hypothèse initiale, de développer le protocole expérimental, d'effectuer la plupart des manipulations expérimentales, d'avoir procédé à l'analyse des résultats et d'avoir contribué à la rédaction des différentes sections de l'article. La version du manuscrit présentée dans cette thèse a été adaptée depuis le document final soumis pour évaluation au *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* afin de répondre aux exigences de l'Université c'est-à-dire que les figures et leurs légendes associées ont été placées aux bons endroits dans le texte et la numérotation de celles-ci ainsi que la numérotation des sections ont été modifiées afin d'être intégrées dans le présent ouvrage. Toutefois les numéros des figures apparaissent sous la nouvelle

numérotation. De plus certaines modifications ont été apportées suite aux commentaires du jury de cette thèse.

### 13.5 Résumé en français

La sclérose en plaques (SEP) est une maladie neurodégénérative affectant nettement plus les femmes que les hommes âgés de 20 à 45 ans. Nous avons montré précédemment la contribution significative de la chymase de souris mMCP-4 dans la synthèse de l'endothéline-1 (ET-1) chez des souris saines, ainsi que dans un modèle murin d'encéphalopathie auto-immune expérimentale (EAE). Notre objectif est d'étudier, dans le modèle murin de SEP, si l'activité de la mMCP-4 est modulée uniquement dans le SNC ou si elle peut être étendue à la circulation systémique.

Les effets cardiovasculaires de l'ET-1 et de la big-ET-1 administrées par voies systémique ou intrathécale (i.t.c.) ont été étudiés en phase préclinique de l'EAE chez des souris conscientes et instrumentées en télémétrie. L'activité enzymatique spécifique de la chymase a été mesurée à partir d'extraits de poumons, de cerveau et de mastocytes *in vitro*. Enfin, l'impact de l'immunisation en EAE a été évalué sur l'expression relative de l'ARNm dans les poumons ou le cerveau de différents gènes de la voie endothélinergique ou de l'IL-33 ainsi que du TNF- $\alpha$  immunoréactif.

L'administration systémique ou intrathécale de big-ET-1 déclenche des augmentations de la pression artérielle liées à la dose chez la souris consciente. Une semaine après l'EAE, les réponses pressives à la big-ET-1, mais pas à l'ET-1, ont été potentialisées chez les souris de type sauvage, mais pas chez les souris mMCP-4 KO. L'EAE a déclenché, dans les homogénats cérébraux et les mastocytes péritonéaux, la perte de l'activité hydrolytique spécifique à la mMCP-4, attribuable à une dégranulation mastocytaire. Des augmentations de l'ARNm de la prépro-ET-1 et de l'IL-33 d'origine pulmonaire, mais non cérébrale ont été trouvées chez les souris KO et ont encore augmenté suite à l'immunisation en EAE pour une semaine uniquement dans cette souche. Enfin, les taux de TNF- $\alpha$  étaient également augmentés dans le sérum de souris mMCP-4 KO une semaine après l'immunisation en EAE.

L'activité mMCP-4 est augmentée à la fois au niveau central et systémique dans un modèle de souris d'EAE.

## 13.6 Manuscript original

**Experimental autoimmune encephalomyelitis potentiates mouse mast cell protease 4-dependent pressor responses to centrally or systemically administered big- endothelin-1.**

Louisane Desbiens, Louis Gendron, Marjan Gharagozloo, Catherine Lapointe, Laurence Vincent, Gunnar Pejler<sup>2,3</sup>, Denis Gris, Pedro D'Orléans-Juste†\*

Department of Pharmacology and Physiology, Medical School, Université de Sherbrooke, 3001, 12th Avenue North, Sherbrooke, Québec, J1H 5N4, Canada; <sup>2</sup> Department of Medical Biochemistry and Microbiology, Uppsala University BMC, Box 582, 75123 Uppsala, Sweden; <sup>3</sup> Swedish University of Agricultural Sciences, Dept of Anatomy, Physiology and Biochemistry, Uppsala, Sweden.

Running title: Roles of chymase in a mouse model of multiple sclerosis

\* Corresponding author at: Department of Pharmacology and Physiology, Université de Sherbrooke, 3001, 12e Avenue Nord, Sherbrooke, Quebec, Canada, J1H 5N4. E-mail address: [labpdj@usherbrooke.ca](mailto:labpdj@usherbrooke.ca)

### 13.6.1 Abstract

Multiple sclerosis is a neurodegenerative disease affecting predominantly female patients between 20 and 45 years of age. We previously reported the significant contribution of mouse chymase mMCP-4 in the synthesis of endothelin-1 in healthy mice and in a murine model of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE).

In the current study, cardiovascular effects of ET-1 and big-ET-1 administered systemically or intrathecally (i.t.c.) were assessed in the early preclinical phase of EAE in telemetry instrumented/conscious mice. Chymase-specific enzymatic activity was also measured in the lung, brain and mast cells extracts *in vitro*. Finally, the impact of EAE immunization was studied on the pulmonary and the brain mRNA expression of different genes of the endothelin pathway, IL-33, and mature TNF- $\alpha$ .

Systemic or i.t.c. administered big-ET-1 triggered increases in blood pressure in conscious mice. One week post-EAE, the pressor responses to big-ET-1 were potentiated in WT but not in mMCP-4 KO mice. EAE triggered mMCP-4 specific activity in cerebral homogenates and peritoneal mast cells. Enhanced pulmonary, but not cerebral prepro-ET-1 and IL-33 mRNA were found in KO mice and further increased one week post EAE-immunization, but not in wild type animals. Finally, TNF- $\alpha$  levels were also increased in serum from mMCP-4 KO mice, but not wild type, one week post-EAE. Our study suggests that mMCP-4 activity is enhanced both centrally and systemically in a mouse model of EAE.

### 13.6.2 Introduction

Multiple sclerosis (MS), mostly caused by complex cellular interactions (Duffy et al., 2014; Cheng et al., 2017; Luo et al., 2017; Ponath et al., 2018), is a chronic autoimmune and degenerative disease of the central nervous system (CNS) associated with inflammation, tissue insult, and neuromotor dysfunction (Lublin, 2005; Compston and Coles, 2008; Huang et al., 2016).

In MS patients, although vascular and endothelial integrity are unaffected (Mincu et al., 2018), several cardiovascular co-morbidities such as hypertension, heart diseases, and cardio-metabolic disorders have been reported (Ewanchuk et al., 2018).

Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) reproduces the major cardinal signs of neurodegeneration and associated spinal cord lesions occurring in MS (Kipp et al., 2012; Ben-Nun et al., 2014). In EAE, a significant contribution of mast cell (MC) degranulation to the etiology of the neurodegenerative disease was initially reported by Secor and colleagues (Secor et al., 2000). This concept was later challenged however as complete removal of MCs in a “Kit independent” MC-deficient strain, no significant impact on development of the disease (Feyerabend et al., 2011). Directly targeting MCs in MS thus remains an open question.

MCs secrete, among several pro- and anti-inflammatory factors, chymase, a serine protease that hydrolyzes Endothelin-1 (ET-1) from its precursor, big-Endothelin-1 (big-ET-1), *in vitro* (Petrie et al., 2001; Borland et al., 2005; Simard et al., 2009). Mouse MC express several chymases, of which mouse mast cell protease 4 (mMCP-4), is the most functionally similar to its human counterpart, CMA-1 (Semaan et al., 2015). Indeed, recombinant mMCP-4 efficiently converts big-ET-1 to an intermediate precursor, ET-1 (1-31), which is then readily hydrolyzed to ET-1 via the ubiquitous neutral endopeptidase 24/11 (Fecteau et al., 2005; Semaan et al., 2015).

Antagonism of ET<sub>A</sub> receptors for ET-1 reduces the severity of the EAE in rats (Shin et al., 2001) whereas blocking the ET<sub>B</sub> receptors indirectly inhibits oligodendrocyte progenitor cells differentiation as well as re-myelination in the mouse (Hammond et al., 2015). Plasma levels of ET-1 are elevated in patients with MS (Haufschild et al., 2001; Pache et al., 2003)

and the use of a mixed ET<sub>A</sub>/ET<sub>B</sub> antagonist, bosentan, normalizes cerebral blood flow in these patients (D'Haeseleer et al., 2013).

ET-1, on the other hand, administered either systemically in the conscious mouse (Semaan et al., 2015) or centrally in the non-anesthetized rat (Poulat et al., 1994), triggers a trademark protracted increase of blood pressure *in vivo*. There is no evidence in the literature, to our knowledge, on the cardiovascular responses prompted by centrally administered ETs in the conscious mouse model.

mMCP-4 is also involved in early neuromotor disabilities associated with EAE (Desbiens et al., 2016). Indeed, EAE triggers a significant increase in mMCP-4 mRNA levels in the CNS as well as production of cerebral immunoreactive ET-1. An open question however remains: does EAE trigger an increase in mMCP-4 activity outside of the CNS as well? MCs degranulation products are mediators of the allergic response to EAE outside the CNS (Tanzola et al., 2003). In addition, the lungs have been shown to be the niche in which the self-reactive T cells are activated, allowing them to enter the target tissues like the CNS where they trigger pathogenic events associated with EAE (Odoardi et al., 2012).

Inflammation in MS is associated with a 'cytokine storm' within the CNS (Link, 1998). With regards to the present study, interleukin-33 (IL-33) reduces neuronal damage in the EAE model by suppressing IL-17 and Interferon gamma (Jiang et al., 2012). Furthermore, repression of IL-33 increases neuronal damage in EAE mice with specific impact on immune and neural cells (Xiao et al., 2018). In addition, another cytokine, Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- $\alpha$ ), increases the expression of IL-33 in human epidermal keratinocytes as well as in psoriasis (Balato et al., 2014) and non-selective TNF- $\alpha$  blockers enhance demyelination in MS patients (van Oosten et al., 1996; Dreyer et al., 2016).

Of relevance to the present study, Piliponsky et al, have shown that TNF- $\alpha$  is a substrate for mMCP-4 in a mouse model of sepsis (Piliponsky et al., 2012) and Waern et al, showed that IL-33 is a preferred substrate for chymase in allergic airway inflammation (Waern et al., 2013). Thus, in conditions of chronic repression of the murine chymase, one would expect an increase in the levels of IL-33 as well as TNF- $\alpha$ , particularly in inflammatory settings.

The aim of the present study was to investigate, in the mouse model of MS, if mMCP-4 activity is modulated solely in the CNS or if it can be extended to the systemic



circulation. Our central hypothesis is that EAE enhances mMCP-4 dependent conversion and thus biological activity of the ET-1 precursor, big-ET-1, within and outside of the central nervous system.

### 13.6.3 Material and methods

#### 13.6.3.1 Mice

C57Bl/6 mice genitors were purchased from Charles River Canada (Montréal, QC, Canada) and mMCP-4 KO mice genitors were provided by Dr Gunnar Pejler (Uppsala University, Sweden) and were bred in our facility. The mMCP-4 KO mice were backcrossed for over 10 generations with C57Bl/6 congeners and are therefore highly congenial with the later strain (Tchougounova et al., 2003). We and others had previously reported, in mMCP-4 KO mice *in vivo* as well as in tissues or MCs derived from this mouse strain, the complete loss of chymase-dependent hydrolytic activity (Hendrix et al., 2013; Houde et al., 2013; Semaan et al., 2015).

All animals were kept at constant room temperature (23°C) and humidity (78%) under a controlled 12-12h light/dark cycle. Mice had free access to standard chow and tap water *ad libitum*. Animal care and experimentations were carried out in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals as adopted and promulgated by the U.S. National Institutes of Health, and were approved by Ethics Committee on Animal Research of the Université de Sherbrooke in accordance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care.

#### 13.6.3.2 Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)

Induction of EAE was performed in accordance to (Miller et al., 2007). In brief, a 1 : 1 emulsion mixture of myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG<sub>35-55</sub>) (Genemed Synthesis Inc., San Antonio, TX, USA) and complete Freund's Adjuvant (CFA) (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA) supplemented with 10 mg/ml of heat-killed *Mycobacterium tuberculosis* H37RA (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) was prepared. Female mice (8-10 weeks old) were injected subcutaneously at two sites (100 µl per site) adjacent to the tail with the emulsion. Pertussis toxin (200 ng) (List Biological Laboratories Inc., Campbell, CA, USA) was administered intraperitoneally on the day of immunization. Mice were scored daily with the following scale to assess clinical scores: 0, no sign of clinical disease; 0.5, partial tail paralysis (loss of tip tail tonus); 1, tail flaccidity or hind limb weakness; 2, limp

tail and weakness in limb; 3, partial hind limb paralysis; 4, total hind limb paralysis; and 5, moribund state or death.

### *13.6.3.3 RNA extraction and quantitative RT-PCR*

RNA from the right lung lobes of healthy or EAE 1 week mice was extracted with RNeasy Fibrous Tissue Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. Briefly, tissues were homogenized with tissue grinder Scilogex D-160 homogenizer (Rocky Hill, CT, USA). All steps were followed as mentioned by the manufacturer except for treatment with DNase where 2  $\mu$ l of DNase (Omega bio-tek, Norcross, GA, USA) was diluted in 78  $\mu$ l of RDD buffer and added to the column of the extraction kit for 30 minutes at room temperature. After a few additional steps, an optional centrifugation step at maximal speed for 1 minute was performed prior to elution with 40  $\mu$ l of RNase-free water. The RNA eluate was filtered once more through the column before final centrifugation at 10,000 g for 1 minute.

RNA from the right brain hemispheres derived from healthy or EAE 1 week mice was extracted using 1 mL of RiboZol™ reagent (Amresco inc., Solon, OH, USA). Tissues were homogenized with a glass-Teflon homogenizer. Chloroform (200  $\mu$ l) (J.T. Baker, Central Valley, PA, USA) was added to each tube and incubated at room temperature for 3 minutes followed by centrifugation at 12,000 g for 15 minutes at 4°C. Non-opaque supernatants were collected and 500  $\mu$ l of isopropanol (Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada) was added for RNA precipitation and incubated 10 minutes at room temperature followed by centrifugation at 12,000 g for 10 minutes at 4°C. Pellets were washed in 1 ml 75% ethanol followed by a 7,500 g centrifugation step at 4°C for 5 minutes before being re-dissolved in 100  $\mu$ l of DEPC water and incubated at 55°C for 10 minutes.

RNA concentration was determined by absorbance at  $A_{260}$ . We used 1  $\mu$ g of RNA for subsequent experiments. cDNA was synthesized using an oligo(dT)<sub>12-18</sub> primer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), dNTPs mix at 10  $\mu$ M each (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), SuperScript III buffer with DTT, RNaseOUT and SuperScript III (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Quantitative PCR was performed for actin, prepro-ET-1, ECE1a, ET<sub>A</sub> receptor, ET<sub>B</sub> receptor and IL-33 by monitoring in real time the fluorescence increase of the SYBR Green

with the Perfecta SYBR Green SuperMix, low ROX (Quanta Biosciences, Gaithersburg, MD, USA) using the MX3000P Multiplex Quantitative PCR System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Primers (IDT, Coralville, IA, USA) were used at final concentration of 300 nM per primer and sequences were designed as follows:

preproET-1 F : 5'- GCA CAA CCG AGC ACA TTG -3'  
 preproET-1 R : 5'- CCA GCC AGC ATG GAG AGT -3'  
 ECE1a F : 5'- GCG GGG TC CTT CTT CCT GGG GAA -3'  
 ECE1a R : 5'- CTG CAG GGA AGA AGC CAG GAG GGG -3'  
 ET<sub>A</sub> F : 5'- CAA CCA TTA CGC CAC AGA -3'  
 ET<sub>A</sub> R : 5'- CAG GAA AGA CCC ATT GGC -3'  
 ET<sub>B</sub> F : 5'- TCA ACA CCG GAT ATA TTC ACG GGC -3'  
 ET<sub>B</sub> R : 5'- GCT CTG CTG AAG TGC TGA CTA AGA -3'  
 IL-33 F : 5'- TGA GAC TCC GTT CTG GCC TC -3'  
 IL-33 R : 5'- CTC TTC ATG CTT GGT ACC CGA T -3'  
 β-actin F : 5'- GAT CAA GAT CAT TGC TCC TCC TGA GC -3'  
 β-actin R : 5'- GCA GCT CAG TAA CAG TCC GCC TAG -3'

The cycle profile was: 10 minutes at 95°C, followed by 40 cycles of denaturation for 30 seconds at 95°C, annealing for 1 minute at 60°C, and extension for 1 minute at 72°C, followed by final denaturation for 1 minute at 95°C, 30 seconds at 55°C and 30 seconds at 95°C for prepro-ET-1, ECE1a and IL-33. The annealing time for ET receptors genes was 30 seconds at 60°C. The fluorescence was measured after each annealing period during the 40 cycles and the complete dissociation curve was constructed between the 30 seconds period at 55°C and the final 30 seconds at 95°C.

As β-actin levels were stable between healthy and immunized mice, the latter mRNA was used as the internal control for normalization and relative expressions of preproET-1, ECE1a, ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> receptors and IL-33 were calculated using the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method.

#### *13.6.3.4 Hemodynamic studies in conscious mice*

Mice were implanted with radio telemetry transmitters (TA11PA-C10, Data Science International, St Paul, MN, USA). Mice were anesthetized with ketamine/xylazine (87/13 mg/kg intramuscular). The left common carotid artery was isolated and the catheter of telemetry probe was implanted into the aortic arch. The body of the transmitter was placed subcutaneously into the right flank of the animal. An analgesia protocol was maintained for 24 hours after surgery with buprenorphine (0.1 mg/kg subcutaneous every 6-9 hours). A post-operative recovery period of seven to ten days was allowed prior to recording and injections.

All mice were trained for two days to the contention cage and during two additional days with intracaudal vein injection of saline. Thereafter, mice were placed in contention cages and a first dose of ET-1 (1 fmol/kg) (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA) or big-ET-1 (10 or 100 fmol/kg) (Phoenix Pharmaceuticals Inc., Burlingame, CA, USA) was injected intravenously (i.v.) in a total volume of 100  $\mu$ l. Mice were then immediately rehoused. After two days, a second dose of peptide (0.1 pmol/mouse for ET-1 or 0.5 or 5 pmol/mouse for big-ET-1) was administered intrathecally (i.t.c.) by an experienced experimenter as previously described (Fairbanks, 2003). Briefly, mice were maintained by the hips between the thumb and index fingers to open the space between the L5 and L6 vertebrae. We injected 5  $\mu$ l of the agonist with 10  $\mu$ l Hamilton syringes mounted with a 30½G needle and mice were released in their own cages. Two days later, mice were EAE-induced for a period of 7 days prior to i.t.c. administration of the agonist followed by a second i.v. injection done 2 days later. Recording of hemodynamic parameters (mean arterial pressure (MAP), systolic blood pressure (SBP), diastolic blood pressure (DBP) and heart rate (HR)) was initiated 5 minutes before the contention of the animal for the drug administration, to determine the basal pressure, and up to 30 minutes post agonist injections. Data points were recorded every 30 seconds with the acquisition software Dataquest ART 4.33 (DSI, St Paul, MN, USA). Each mouse was administered only one agonist. All data were analyzed with the Dataquest ART 4.33 analysis software. Blood pressure variations ( $\Delta$ ) obtained after the injection of each agonist were calculated as the difference between blood

pressure increases post-injection and basal pressure recorded prior to administration of each agent.

#### *13.6.3.5 Measurement of brain and lung endogenous TNF- $\alpha$*

Frozen left brain hemispheres or left lung lobes were weighed and homogenized in 1 ml for lung tissues or 2 ml for brain tissues of ice-cold lysis buffer (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) supplemented with protease inhibitor cocktail (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) using a glass-Teflon homogenizer. Tissue lysates were centrifuged at 13,000 g at 4°C for 20 minutes and supernatants transferred to new tubes. Serum was obtained by full speed centrifugation of blood samples for 20 minutes. Serum or tissue homogenates TNF- $\alpha$  levels were determined using Mouse TNF-alpha Quantikine ELISA Kit (R&D systems, Minneapolis, MN, USA), according to the manufacturer's instructions. The concentrations of TNF- $\alpha$  were reported in pg/ml.

#### *13.6.3.6 Peritoneal mast cells isolation*

MCs from the peritoneal cavity were isolated from healthy and EAE 1 week mice and used for measurement of chymase activity. Mice anesthetized with ketamine/xylazine (87/13 mg/kg i.m.) were injected with 5 ml of isolation buffer (PBS pH 7.4 containing 1 mg/ml of BSA and 0.5 mg/ml of heparin) in the peritoneal cavity. The peritoneal fluids were collected following a 1 minute abdominal massage and centrifuged at 200 g for 5 minutes. Pellets were suspended in 1 ml RPMI-1640 medium containing 2 mM of L-glutamine, 100 U/ml of penicillin and 1 mg/ml of BSA and subsequently incubated for 1 hour at 37°C in tissue culture dishes 35 X 10 mm in order to sediment and let to adhere to the plastic surface of the dish the macrophages and leukocytes thus allowing a purification of the MCs. RPMI-1640 medium and non-adherent cells were collected and centrifuged at 200 g for 5 minutes. Pellets were suspended in 1 ml isolation buffer and cells were counted according to the Moore & James method with toluidine blue (Moore and James, 1953). A final centrifugation was performed at 200 g for 5 minutes and pellets were suspended in PBS (pH 8) in a concentration of 10,000 MCs/ $\mu$ l and used as described below.

#### *13.6.3.7 Cerebral protein extraction*

Chymase containing homogenates were first extracted from the left brain hemisphere of healthy or EAE 1 week mice as described (Kakizoe et al., 2001). The brain was homogenized in 10 volumes (vol/wt) of 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) using a glass-Teflon homogenizer. The homogenate was then centrifuged at 18,000 g for 30 minutes at 4°C. The supernatant was discarded since it contains soluble proteins which may interfere with the chymase activity. Those three steps were repeated twice. Following the last centrifugation, the pellet was suspended in 5 volumes (vol/wt) of 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4), 2 M KCl, and 0.1 % Triton X-100. The homogenate was agitated overnight at 4°C and subsequently centrifuged at 18,000 g for 30 minutes at 4°C. The resulting supernatant was kept as the final chymase extract and kept at -80°C until used. Protein concentrations were determined by the Bradford's method with  $\gamma$ -globulin (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA) as standard.

#### *13.6.3.8 Pulmonary protein extraction*

Chymase-containing homogenates were extracted from the left lobes of the lung from healthy or EAE 1 week mice as previously described (Houde et al., 2013). Tissues were homogenized in 2 volumes (200  $\mu$ l) of PBS (pH 7.4) using a glass-Teflon homogenizer. The homogenates were then centrifuged at 18,000 g for 20 minutes at 4°C. The resulting supernatants were collected and kept at -80°C until used. Protein concentrations were determined by the Bradford's method with  $\gamma$ -globulin as standard.

#### *13.6.3.9 Measure of chymase enzymatic activity*

The brain chymase extracts were diluted to obtain a final concentration of 1 mg protein/ml and incubated for 20 minutes at 37°C, vortex mixed every 5 minutes, with a cathepsin G inhibitor I (Cayman Chemical, Ann Harbor, MI, USA) at a final concentration of 10  $\mu$ M in

order to discriminate the chymase from cathepsin G activity. Lung chymase extracts were diluted to obtain a final concentration of 1 mg protein/ml and incubated for 20 minutes at 37°C, vortex mixed every 5 minutes. These solutions or peritoneal MC extracts (100,000 MCs) were placed in 96-well plates. The chymase activity was determined by the hydrolysis rate of 10  $\mu$ M of the substrate, Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC (Peptide Institute inc., Osaka, Japan), at 37°C. The fluorescence of the released AMC molecule was measured with an Infinite M1000 spectrophotometer (Tecan Group Ltd., Männerdorf, Swiss) with  $\lambda_{\text{ex}} = 370$  nm and  $\lambda_{\text{em}} = 460$  nm for 15 minutes.

#### *13.6.3.10 Statistical analysis*

All data are presented as the mean  $\pm$  SEM. All statistical analyses were conducted using the GraphPad Prism 7 software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Statistical significance was reached when the “P” value was below 0.05 and determined using one-way ANOVA and multiple Student’s t test.



### 13.6.4 Results

#### 13.6.4.1 *In vivo* response to endothelin peptides in conscious mice

We investigated the impact of mouse immunization in EAE on basal hemodynamic parameters. Firstly, basal blood pressure parameters, prior to EAE treatments were similar in WT and mMCP-4 KO mice (respectively MAP;  $91.39 \pm 5.27$  and  $92.96 \pm 6.15$  mmHg, SBP;  $101.67 \pm 6.19$  and  $102.76 \pm 5.32$  mmHg, DBP;  $81.59 \pm 6.07$  and  $80.39 \pm 5.18$  mmHg and HR;  $659.44 \pm 19.34$  and  $677.15 \pm 14.97$  beats/minute). As shown in figure 1A, the induction of EAE did not affect basal parameters. Figure 1B represents the typical time-course profile of the MAP and HR responses to an intravenous or intrathecal injection of ET-1 (1 fmol/kg or 0.1 pmol/mouse respectively) in healthy WT mice. In our experiments, we do not observe particular change in HR after injection of big-ET-1 or ET-1. We suggest that this is caused by the particularly elevated basal HR in our conscious mice. Another possible hypothesis to explain this was the doses of agonists used which could not be high enough to induce an increase in HR.

Figure 2A shows the maximal increase of the MAP after intravenous administration of big-ET-1 in conscious and unrestrained mice. Intravenous administration of big-ET-1 (10 or 100 fmol/kg) prompted dose-dependent increases in MAP in healthy WT mice which were significantly potentiated in congeners one week post-EAE immunization ( $p < 0.01$ ). In healthy mMCP-4 KO mice, we observed a significant reduction of the MAP increases when compared to WT congeners ( $p < 0.001$ ) and no potentiation of the response to big-ET-1 post-EAE induction. Finally, an intravenous administration of ET-1 (1 fmol/kg) prompted similar blood pressure responses in WT and mMCP-4 KO mice, in healthy or 1 week post EAE-immunization (figure 2B).

Similarly, i.t.c. administered big-ET-1 (0.5 or 5 pmol/mouse) increased MAP in healthy WT mice in a dose-dependent fashion. Conversely, a decreased MAP was observed in healthy mMCP-4 KO mice ( $p < 0.05$ ). The increases in MAP were significantly potentiated 1 week post-EAE in WT ( $p < 0.05$ ) but not in EAE-induced mMCP-4 KO mice (figure 2C). In contrast, intrathecal administration of ET-1 (0.1 pmol/mouse) induced a similar blood pressure response in healthy and EAE-immunized WT or mMCP-4 KO mice (figure 2D).

Figures 2E and 2F show the time-course profile of MAP increases in response to intrathecal administration big-ET-1 i.t.c. (0.5 pmol/mouse) in WT or mMCP-4 KO mice, either in healthy conditions or 1 week post-EAE.

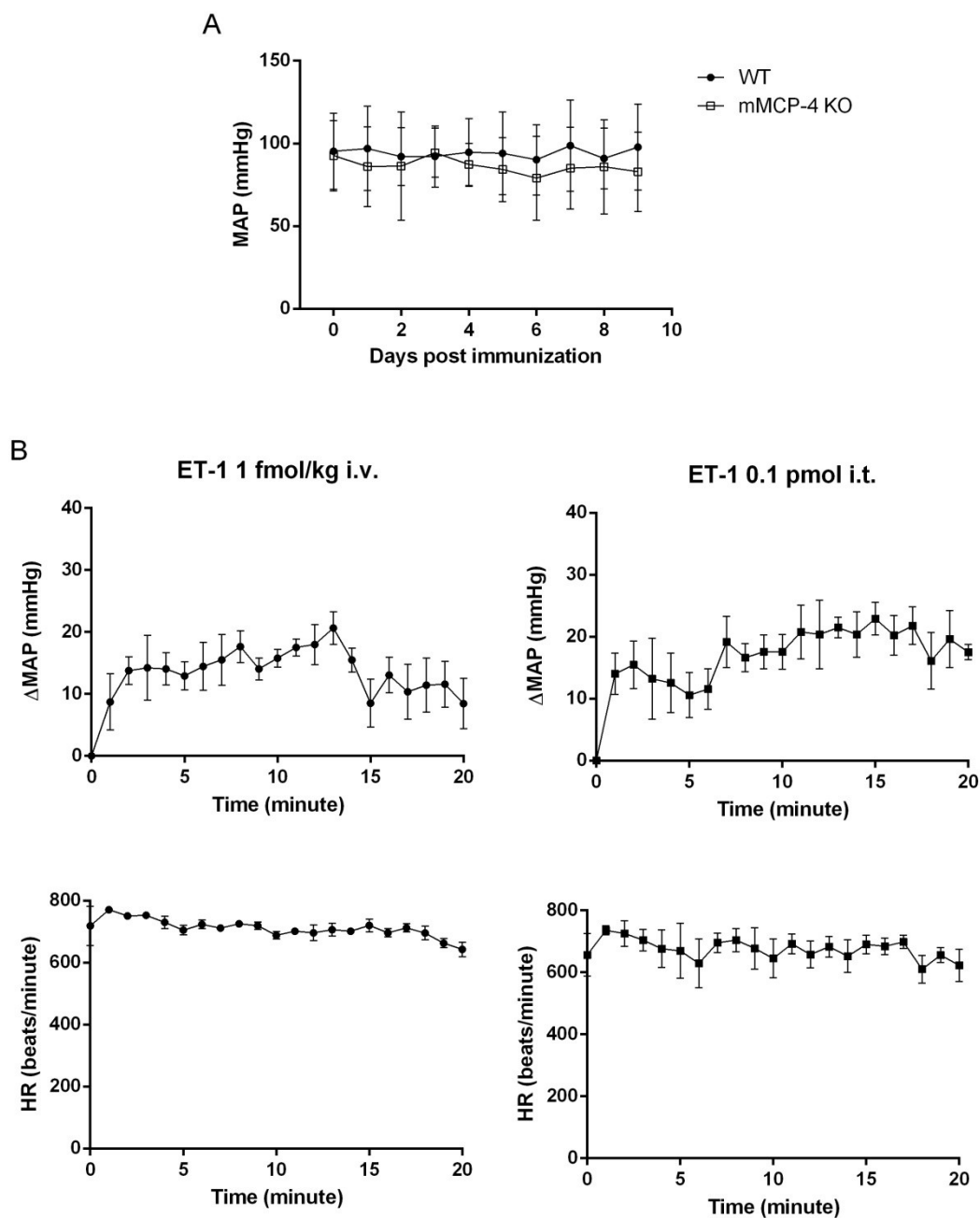


Figure 26 : Figure 1 de Desbiens *et al.* *JPET*/2018/256016.

Figure 1 : A) Effect of EAE in the pre-clinical phases on basal mean arterial pressure (MAP) in conscious mice. Each point corresponds to mean  $\pm$  SEM of WT ( $n = 8$ ) and mMCP-4 KO ( $n = 7$ ) mice. B) Typical time course profile of MAP variation (upper panels) and HR (lower panels) in healthy WT mice in response to exogenous intravenous administration of ET-1 (1 fmol/kg) (left panels) or i.t.c. administered ET-1 (0.1 pmol/mouse) (right panels). Each point corresponds to the mean  $\pm$  SEM of average of at least 4 different experiments.

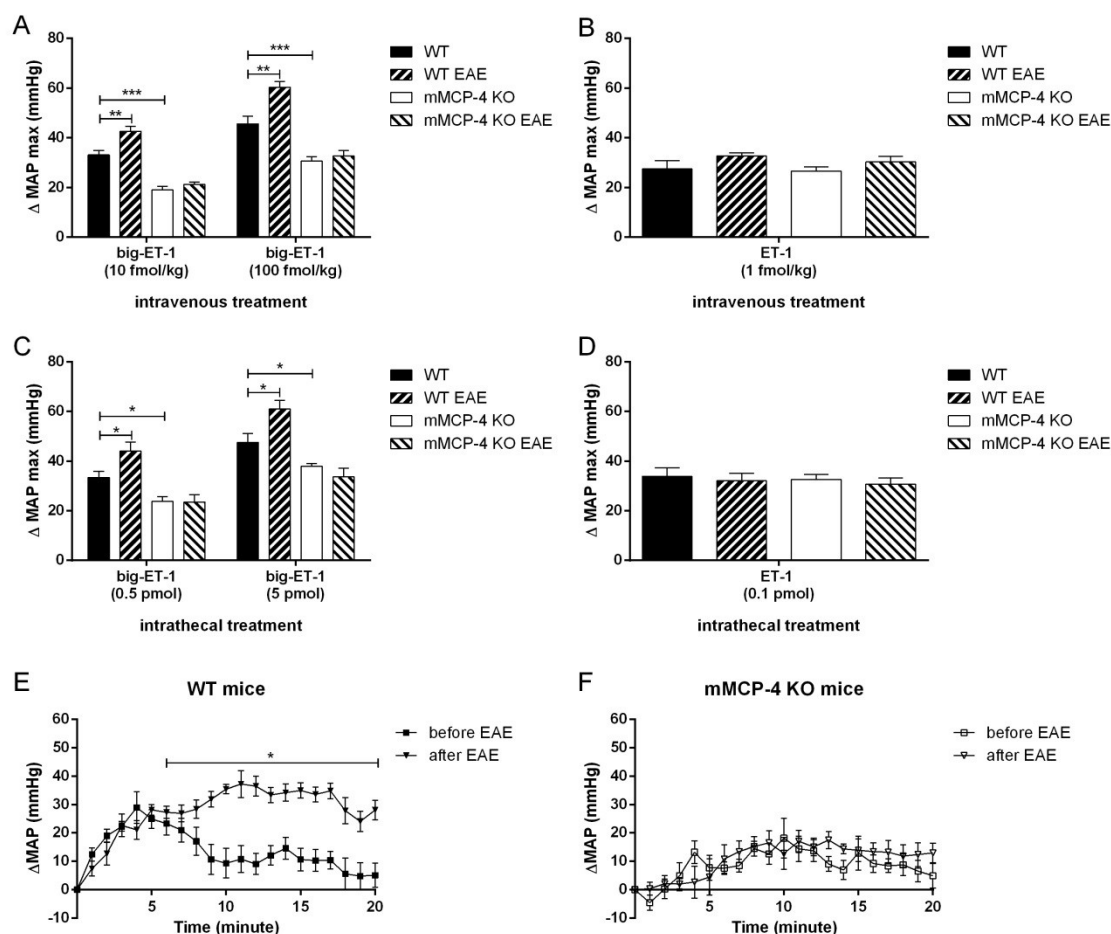


Figure 27 : Figure 2 de Desbiens *et al.* *JPET*/2018/256016.

Figure 2 : Functional activity of chymase on maximal mean arterial pressor responses in a conscious WT or mMCP-4 KO mouse model of EAE to exogenous A) big-ET-1 administered systemically by intravenous injection via caudal vein, B) ET-1 administered i.v., C) big-ET-1 centrally administered by i.t.c. injection, D) ET-1 administered i.t.c., E) Time-course profile to i.t.c. administration of big-ET-1 0.5 pmol/mouse in healthy (closed square) or post-EAE (closed triangle) WT mice and F) Time-course profile to i.t.c. administered big-ET-1 (0.5 pmol/mouse) in healthy (open squares) or EAE (open triangles) mMCP-4 KO mice. Each bar or point represents the mean  $\pm$  SEM of MAP maximal increase for  $n = 4$  to 8 mice by group. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$  compared to healthy WT group.

#### **13.6.4.2 Enzymatic activity in peritoneal mast cells, brain and lung**

The hydrolytic activity on the fluorogenic substrate Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC was measured in brain homogenates (figure 3A). We observed a linear increase of the fluorescence in brain extracts of healthy WT mice and to a lesser extent in EAE-induced WT congeners ( $p < 0.05$  when compared to healthy WT mice). Total hydrolytic activity was also significantly reduced in extracts from healthy or EAE-induced mMCP-4 KO mice when compared to healthy WT mice ( $p < 0.05$ ).

Figure 3B shows the hydrolytic activity of the same substrate in peritoneal MCs. As with brain extracts, we observed a linear increase of the fluorescence in healthy WT but not mMCP-4 KO mice. One week post-EAE immunization the hydrolytic activity in peritoneal MCs derived from WT mice was abolished ( $p < 0.05$ , when compared to healthy WT mice) whereas no effects of EAE induction on fluorescence were seen in MCs derived from mMCP-4 KO mice.

Hydrolytic activities were also measured in lung extracts (figure 3C). The maximal fluorescence, detected 15 minutes after initiation of the reaction, was not significantly different between homogenates derived from the two WT groups (healthy or EAE). In contrast, a significant decrease in maximal fluorescence was seen in extracts from healthy mMCP-4 KO mice vs. WT congeners ( $p < 0.05$ ), with no influence of EAE on the hydrolytic activity in lung extracts from the KO strain.

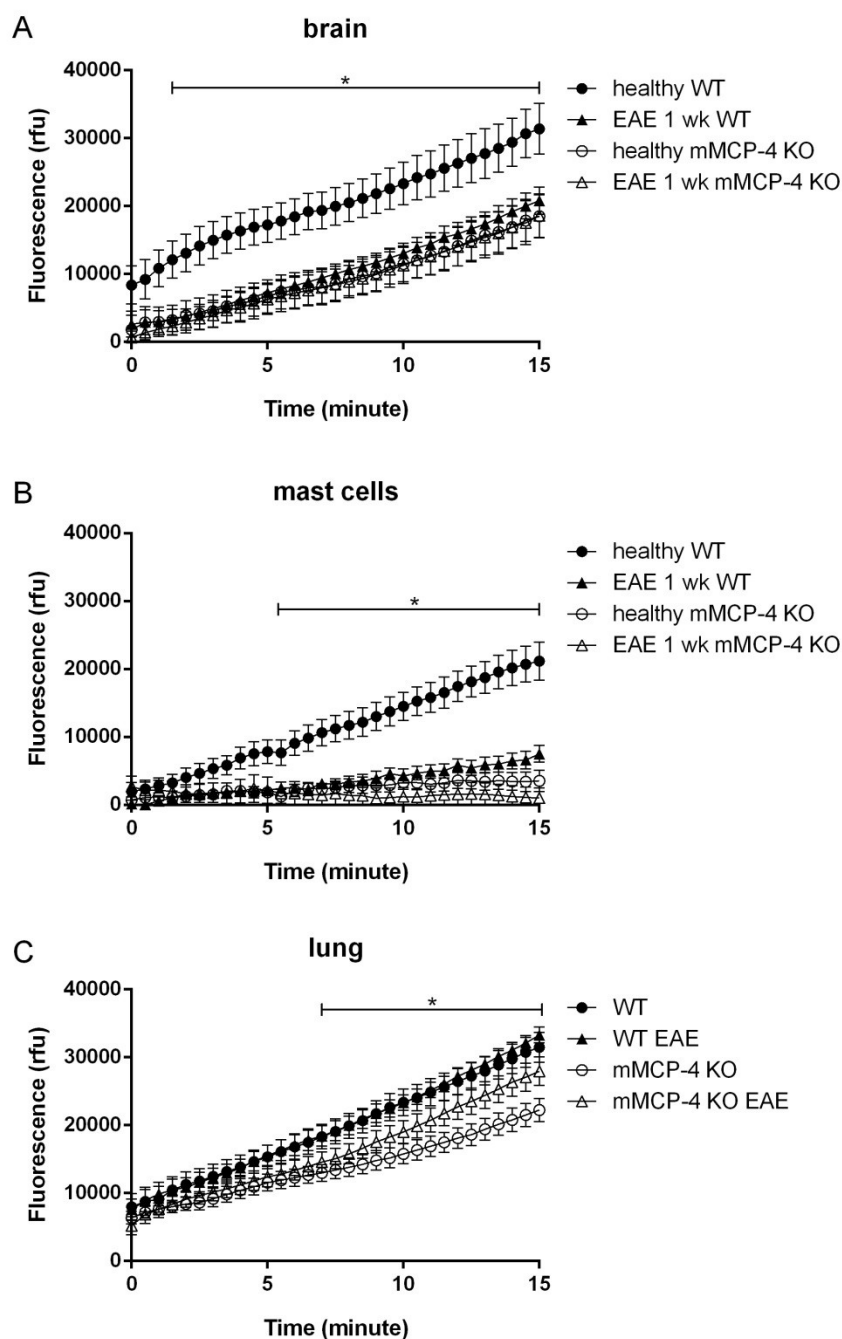


Figure 28 : Figure 3 de Desbiens *et al. JPET/2018/256016*.

Figure 3 : Chymotrypsin-like activity measured *ex vivo* from healthy and 1 week post-EAE WT and mMCP-4 KO mice as increased fluorescence after substrate Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC cleavage in A) brain homogenates, B) peritoneal mast cells and C) lung homogenates. Each point represents mean  $\pm$  SEM of  $n = 6$  to 9 independent experiments realized in duplicate. \*  $p < 0.05$  compared to healthy WT mice.

### 13.6.4.3 Relative mRNA expression of endothelinergic system components

Figure 4A shows the relative expression of cerebral and pulmonary prepro-ET-1 in WT and mMCP-4 KO mice. Lungs and brain mRNA were extracted from healthy or 1 week post-EAE mice and quantified using the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  calculation method and  $\beta$ -actin as the housekeeping gene. The levels of prepro-ET-1 mRNA in the brain did not differ among the four groups of mice studied. In pulmonary extracts, although no difference in the expression of prepro-ET-1 mRNA was detected in WT mice 1 week post-EAE immunization, an increase in prepro-ET-1 mRNA levels was found in healthy mMCP-4 KO mice when compared to WT congeners ( $p < 0.05$ ). Prepro-ET-1 mRNA levels were further increased one week post-EAE immunisation in the KO congeners ( $p < 0.001$  compared to healthy WT mice;  $p < 0.001$  compared to healthy mMCP-4 KO mice).

We also measured the cerebral and pulmonary expression of endothelin converting enzyme 1a (ECE1a) with no differences measured in WT or mMCP-4 KO either healthy or post-EAE immunization (brain: healthy WT;  $1.00 \pm 0.36$ , WT EAE;  $1.17 \pm 0.41$ , healthy mMCP-4 KO;  $1.24 \pm 0.23$ , mMCP-4 KO EAE;  $1.64 \pm 0.54$ , lungs: healthy WT;  $1.00 \pm 0.58$ , WT EAE;  $0.76 \pm 0.38$ , healthy mMCP-4 KO;  $0.93 \pm 0.70$  and mMCP-4 KO EAE;  $0.79 \pm 0.61$ ) (data not shown).

We also evaluated the mRNA expression of the  $ET_A$  or  $ET_B$  receptors in lung and brain extracts. In the brain, we did not observe any change in the expression of these two receptors ( $ET_A$  : healthy WT;  $1.00 \pm 0.36$ , WT EAE;  $1.28 \pm 0.44$ , healthy mMCP-4 KO;  $1.18 \pm 0.28$ , mMCP-4 KO EAE;  $1.07 \pm 0.46$ ,  $ET_B$  : healthy WT;  $1.00 \pm 0.07$ , WT EAE;  $1.09 \pm 0.12$ , healthy mMCP-4 KO;  $1.01 \pm 0.06$ , mMCP-4 KO EAE;  $1.02 \pm 0.17$ ). Furthermore, no significant differences were found in the pulmonary expression of ET-1 receptors between WT and mMCP-4 KO mice, nor between these two groups after EAE immunization ( $ET_A$  : healthy WT;  $1.00 \pm 0.60$ , WT EAE;  $1.04 \pm 1.25$ , healthy mMCP-4 KO;  $1.34 \pm 0.34$ , mMCP-4 KO EAE;  $1.55 \pm 0.71$ ,  $ET_B$  : healthy WT;  $1.00 \pm 0.50$ , WT EAE;  $1.62 \pm 1.10$ , healthy mMCP-4 KO;  $1.20 \pm 0.45$ , mMCP-4 KO EAE;  $1.74 \pm 0.60$ ) (data not shown).

#### **13.6.4.4 Relative mRNA expression of IL-33**

We also investigated if EAE has an impact on mRNA levels of IL-33. As seen in figure 4B, no significant differences were found in cerebral IL-33 mRNA levels in WT EAE-immunized group or in mMCP-4 KO mice when compared to baseline levels in healthy WT mice. In contrast, an increased expression of IL-33 mRNA in the lung was measured in healthy mMCP-4 KO ( $p < 0.01$ ) as well as in mMCP-4 KO one week post-EAE when compared with baseline levels in healthy WT mice ( $p < 0.001$ ). Notably, we observed a greater expression of IL-33 in the healthy WT brain compared to healthy WT lungs (3167 fold) (data not shown).



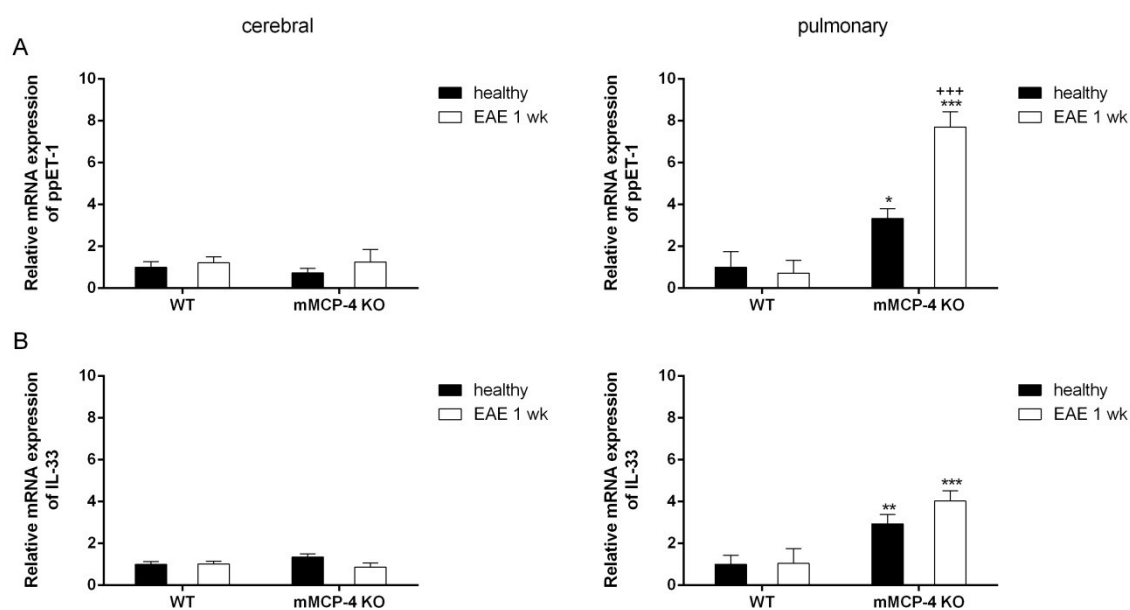


Figure 29 : Figure 4 de Desbiens *et al.* *JPET*/2018/256016.

Figure 4 : mRNA relative expression from healthy (closed bars) and after 1 week EAE immunization (open bars) mice in brain extracts (left panels) or lung extracts (right panels) for A) the prepro-ET-1 gene or B) the IL-33 gene. Each bar represents the mean  $\pm$  SEM of  $n = 6$  to 12 separate experiments. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  compared to healthy WT mice and +++  $p < 0.001$  compared to healthy mMCP-4 KO mice.

#### **13.6.4.5 Quantification of TNF- $\alpha$ level**

TNF- $\alpha$  in brain or lung tissue homogenates from healthy WT or mMCP-4 KO mice was undetectable by ELISA (data not shown). TNF- $\alpha$  was also non-detectable in serum from healthy WT mice (figure 5). Finally, although low serum levels of TNF- $\alpha$  were measured in WT mice 1 week post-EAE and healthy mMCP-4 KO congeners ( $5.96 \pm 4.69$  and  $3.65 \pm 3.11$  pg/ml respectively) a four-fold increase of TNF- $\alpha$  was observed in serum samples of mMCP-4 KO 1 week post-EAE immunization vs. healthy mMCP-4 KO congeners ( $21.21 \pm 7.82$  pg/ml ( $p < 0.05$ )).

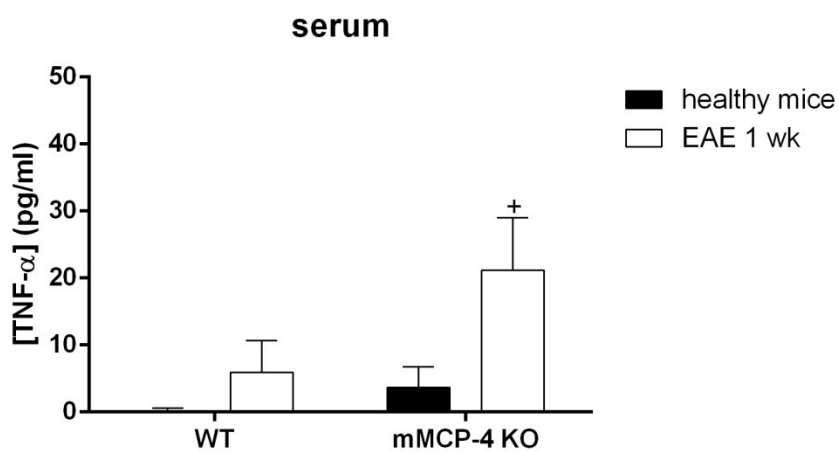


Figure 30 : Figure 5 de Desbiens et al. *JPET/2018/256016*.

Figure 5 : Quantification of serum TNF- $\alpha$  in healthy (closed bars) and 1 week after EAE immunization (open bars) of WT or mMCP-4 KO mice. Each bar represents the mean  $\pm$  SEM of WT (n = 6) and mMCP-4 KO (n = 11 or 12) mice. + p < 0.05 comparing EAE to healthy mMCP-4 KO mice.

### 13.6.5 Discussion

In the present study, we are showing that both systemic and intrathecal administration of big-ET-1 and ET-1 trigger a sustained increase in blood pressure with little effect on the heart rate in conscious mice. In addition, EAE selectively potentiates the pressor response to the precursor big-ET-1 in a mMCP-4-sensitive fashion and prompts MC degranulation and loss of chymase activity in the brain but not in the lungs. Finally, at very early stages of EAE, increases in the expression of IL-33 and of serum levels of TNF- $\alpha$  were detected in the periphery but not in the CNS of mMCP-4 KO mice only.

These results suggest that mMCP-4 driven events prompted by EAE occur within and outside the CNS in the mouse model. Previous studies demonstrated that EAE, actively induced in C57Bl/6 mice with MOG<sub>35-55</sub>, was associated with perivascular inflammation, activation of T cells, CD4<sup>+</sup> and mononuclear cells and subsequent axonal demyelination leading to progressive/ascending hind limb paralysis (Miller et al., 2007). Relevant to the present study, Odoardi et al. were the first to demonstrate that, in MS, transiently airway-residing T cells reprogram their gene expression and alter their surface expression of adhesion molecules responsible for subsequent migration in cerebral blood vessels (Odoardi et al., 2012). Based on the observations of Odoardi et al., it can be expected that EAE could have a significant impact on non-CNS inflammatory processes.

Since it is established that mMCP-4 is involved in the production of ET-1 from big-ET-1 *in vitro* and *in vivo* (Fecteau et al., 2005; Simard et al., 2009; Houde et al., 2013; Semaan et al., 2015), we investigated the influence of EAE on the acute activity of this particular enzyme, both centrally and in the periphery. We have previously reported that mMCP-4 is responsible for 50% of the pulmonary content of ET-1 (Houde et al., 2013). Furthermore, we also reported a reduction in clinical signs and brain levels of ET-1 in mMCP-4 KO mice subjected to EAE, suggesting a role for this protease in the early phases of the neurodegenerative disease (Desbiens et al., 2016).

Interestingly, EAE triggered an increase in mMCP-4 activity in the CNS as well as in the periphery since the dose-dependent responses to big-ET-1, but not to ET-1, administered

i.t.c. or i.v., triggered significant increases of mean arterial pressure in conscious wild type but not mMCP-4 KO mice. To our knowledge, this is the first study comparing the central vs. systemic pressor properties of vasoactive peptides in conscious mice. As previously shown in the rat model (Poulat et al., 1994), ganglionic-blockade with pentolinium significantly reduced basal mean arterial blood pressure and heart rate, but did not alter the pressor responses to ET-1 (data not shown) a possible indication that the blood pressure and heart rate were maintained by vagal reflex through sympathetic nervous system.

Although the characterization of central ET receptors has previously been reported in EAE mice. Antagonists were not used in the present study since the expression of these receptors was not affected in our model and the pressor responses to ET-1 (administered centrally or intravenously) were not affected under any of the conditions tested.

It is also of interest that mRNA levels for the prepro-ET-1 but not for any other components of the ET pathway, were enhanced in the lungs but not the cerebral tissues of EAE mice knocked out for the mMCP-4 gene. In line with these findings, we have previously shown that repression of the chymase gene abolished the increase of brain immunoreactive ET-1 one week post-EAE (Desbiens et al., 2016). In addition, mMCP-4 KO mice show reduced basal levels of the same peptide in the lungs (Houde et al., 2013), suggesting that the increased expression of the precursor of ET-1 reflects a compensatory mechanism for the alternate production of ET-1 in pro-inflammatory conditions in the respiratory tract.

We have previously shown that MCs of murine or human origin release hydrolytically active chymase generating the intermediate ET-1 (1-31) from its precursor big-ET-1 (Semaan et al., 2015). It is, therefore, of interest that EAE prompts release of mMCP-4 from peritoneal MCs and in the brain but not in lung. These results support a role for MC-derived chymase both centrally and in the periphery in the MS mouse model. The absence of chymase-specific hydrolysis in lungs suggests that EAE-prompted differentiation of T cells in the airways has little impact on MC-derived mMCP-4 in the pulmonary system. Thus, the source of big-ET-1 hydrolysis to ET-1 in the systemic circulation may be found elsewhere than in resident MCs located in the airways. Our results thus suggest that the inflammatory process triggered by EAE enhances mMCP-4-like activity in the compartments more involved in the control of

vascular resistance, rather than pulmonary vessels. Notwithstanding the absence of detectable chymase activity post-EAE, it is of interest to note an enhanced expression of IL-33 mRNA in lungs derived from mMCP-4 KO mice when compared to WT congeners; a phenomenon further enhanced by EAE in our study. To our knowledge, there are not reported evidence of a direct effect of this particular chymase isoform on the expression of IL-33. However, it was shown in a previous study that IL-33 protein is a preferred substrate for mMCP-4 proteolytic activity (Waern et al., 2013).

Among several other cytokines, TNF- $\alpha$  upregulates the expression of IL-33 via ERK and p38 pathways in primary nasal epithelial cells and A549 cells (Park et al., 2016) and via PI3K and JNK pathways in nasal fibroblasts (Nomura et al., 2012), leading in both cases to activation of NF- $\kappa$ B (Nomura et al., 2012; Park et al., 2016). In addition, TNF- $\alpha$  is a substrate for the chymase mMCP-4 (Piliponsky et al., 2012). Interestingly, TNF- $\alpha$  was increased significantly in serum derived from mMCP-4 KO vs. WT mice subjected to EAE. We suggest that the latter cytokine is involved in the increased expression of IL-33. This mechanism, in conditions of EAE, appears to be limited to the respiratory tract as opposed to the CNS.

One limitation of the present study is that direct monitoring of mature IL-33 (Waern et al., 2013) has not been evaluated and nor the capacity of mMCP-4 to cleave this cytokine to a shorter form with 10 to 30 more potent activity vs. the nuclear form (Lefrancais et al., 2012; Lefrancais et al., 2014; Roy et al., 2014). It should be noted, however, that the role of IL-33 in EAE remains ambiguous, with some studies showing beneficial effects whereas other studies have demonstrated deleterious effects depending on the strains of mice used as well as the types of treatment including the route of administration, the doses used or the timing of the treatment (Jiang et al., 2012; Li et al., 2012; Milovanovic et al., 2012; Chen et al., 2015; Allan et al., 2016). In addition, the direct impact of anti-TNF- $\alpha$  blockers on the expression of IL-33 in EAE mice was not assessed. Considering however, that TNF- $\alpha$  blockers have recently been counter-indicated in MS patients due to the demyelination properties of these molecules (van Oosten et al., 1996; MSStudyGroup et al., 1999; Probert, 2015), the present study provides mechanistic insights as to why TNF- $\alpha$  should be left intact in this particular neurodegenerative disease.

We have previously reported a significant role for mMCP-4 in EAE (Desbiens et al., 2016). Results from the present study now suggest that mMCP-4 dependent hydrolysis of vasoactive and neurogenic peptides such as ETs is enhanced in the periphery and the CNS at least in this murine model of MS. If our results in the mouse model are translatable to the human disease, chymase inhibitors may be useful to reduce neurogenic decay as well as overall systemic inflammation in these patients.

### 13.6.6 Acknowledgements

This project was financially supported by the Canadian Institutes for Health Research (MOP-57883) as well as by the Etienne Lebel Clinical Research Center of the Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke. L.D. holds PhD studentship from the Fonds de recherche du Québec – Santé (FRQS). M.G. holds PhD studentship from FRQS in partnership with Multiple Sclerosis Society of Canada. P.D.-J. is the recipient of a Joseph C. Edwards Cardiology Chair. D.G. is a recipient of a Junior 2 scholarship from the FRQS.



### 13.6.7 Authorship contributions

Participated in research design: D'Orléans-Juste, Desbiens, Gris, Gharagozloo

Conducted experiments: Desbiens, Gendron, Gharagozloo, Lapointe, Vincent

Performed data analysis: Desbiens, Lapointe, Vincent

Wrote or contributed to the writing of the manuscript: D'Orléans-Juste, Desbiens, Gris, Pejler, Gendron, Gharagozloo, Lapointe, Vincent

### 13.6.8 Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this manuscript.

### 13.6.9 References

- Allan D, Fairlie-Clarke KJ, Elliott C, Schuh C, Barnett SC, Lassmann H, Linnington C and Jiang HR (2016) Role of IL-33 and ST2 signalling pathway in multiple sclerosis: expression by oligodendrocytes and inhibition of myelination in central nervous system. *Acta Neuropathol Commun* **4**:75.
- Balato A, Di Caprio R, Canta L, Mattii M, Lembo S, Raimondo A, Schiattarella M, Balato N and Ayala F (2014) IL-33 is regulated by TNF-alpha in normal and psoriatic skin. *Arch Dermatol Res* **306**:299-304.
- Ben-Nun A, Kaushansky N, Kawakami N, Krishnamoorthy G, Berer K, Liblau R, Hohlfeld R and Wekerle H (2014) From classic to spontaneous and humanized models of multiple sclerosis: impact on understanding pathogenesis and drug development. *J Autoimmun* **54**:33-50.
- Borland JA, Kelsall C, Yacoub MH and Chester AH (2005) Expression, localisation and function of ACE and chymase in normal and atherosclerotic human coronary arteries. *Vascul Pharmacol* **42**:99-108.
- Chen H, Sun Y, Lai L, Wu H, Xiao Y, Ming B, Gao M, Zou H, Xiong P, Xu Y, Tan Z, Gong F and Zheng F (2015) Interleukin-33 is released in spinal cord and suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *Neuroscience* **308**:157-168.
- Cheng Y, Sun L, Xie Z, Fan X, Cao Q, Han J, Zhu J and Jin T (2017) Diversity of immune cell types in multiple sclerosis and its animal model: Pathological and therapeutic implications. *J Neurosci Res* **95**:1973-1983.
- Compston A and Coles A (2008) Multiple sclerosis. *Lancet* **372**:1502-1517.
- Desbiens L, Lapointe C, Gharagozloo M, Mahmoud S, Pejler G, Gris D and D'Orleans-Juste P (2016) Significant Contribution of Mouse Mast Cell Protease 4 in Early Phases of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Mediators Inflamm* **2016**:9797021.
- D'Haeseleer M, Beelen R, Fierens Y, Cambron M, Vanbinst AM, Verborgh C, Demey J and De Keyser J (2013) Cerebral hypoperfusion in multiple sclerosis is reversible and mediated by endothelin-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**:5654-5658.
- Dreyer L, Magyari M, Laursen B, Cordtz R, Sellebjerg F and Locht H (2016) Risk of multiple sclerosis during tumour necrosis factor inhibitor treatment for arthritis: a

- population-based study from DANBIO and the Danish Multiple Sclerosis Registry. *Ann Rheum Dis* **75**:785-786.
- Duffy SS, Lees JG and Moalem-Taylor G (2014) The contribution of immune and glial cell types in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Mult Scler Int* **2014**:285245.
- Ewanchuk BW, Gharagozloo M, Peelen E and Pilutti LA (2018) Exploring the role of physical activity and exercise for managing vascular comorbidities in people with multiple sclerosis: A scoping review. *Mult Scler Relat Disord* **26**:19-32.
- Fairbanks CA (2003) Spinal delivery of analgesics in experimental models of pain and analgesia. *Adv Drug Deliv Rev* **55**:1007-1041.
- Fecteau MH, Honore JC, Plante M, Labonte J, Rae GA and D'Orleans-Juste P (2005) Endothelin-1 (1-31) is an intermediate in the production of endothelin-1 after big endothelin-1 administration in vivo. *Hypertension* **46**:87-92.
- Feyerabend TB, Weiser A, Tietz A, Stassen M, Harris N, Kopf M, Radermacher P, Moller P, Benoist C, Mathis D, Fehling HJ and Rodewald HR (2011) Cre-mediated cell ablation contests mast cell contribution in models of antibody- and T cell-mediated autoimmunity. *Immunity* **35**:832-844.
- Hammond TR, McEllin B, Morton PD, Raymond M, Dupree J and Gallo V (2015) Endothelin-B Receptor Activation in Astrocytes Regulates the Rate of Oligodendrocyte Regeneration during Remyelination. *Cell Rep* **13**:2090-2097.
- Haufschild T, Shaw SG, Kesselring J and Flammer J (2001) Increased endothelin-1 plasma levels in patients with multiple sclerosis. *J Neuroophthalmol* **21**:37-38.
- Hendrix S, Kramer P, Pehl D, Warnke K, Boato F, Nelissen S, Lemmens E, Pejler G, Metz M, Siebenhaar F and Maurer M (2013) Mast cells protect from post-traumatic brain inflammation by the mast cell-specific chymase mouse mast cell protease-4. *Faseb J* **27**:920-929.
- Houde M, Jamain MD, Labonte J, Desbiens L, Pejler G, Gurish M, Takai S and D'Orleans-Juste P (2013) Pivotal role of mouse mast cell protease 4 in the conversion and pressor properties of Big-endothelin-1. *J Pharmacol Exp Ther* **346**:31-37.

- Huang M, Allen DR, Keller DM, Fadel PJ, Frohman EM and Davis SL (2016) Impaired carotid baroreflex control of arterial blood pressure in multiple sclerosis. *J Neurophysiol* **116**:81-87.
- Jiang HR, Milovanovic M, Allan D, Niedbala W, Besnard AG, Fukada SY, Alves-Filho JC, Togbe D, Goodyear CS, Linington C, Xu D, Lukic ML and Liew FY (2012) IL-33 attenuates EAE by suppressing IL-17 and IFN-gamma production and inducing alternatively activated macrophages. *Eur J Immunol* **42**:1804-1814.
- Kakizoe E, Shiota N, Tanabe Y, Shimoura K, Kobayashi Y and Okunishi H (2001) Isoform-selective upregulation of mast cell chymase in the development of skin fibrosis in scleroderma model mice. *J Invest Dermatol* **116**:118-123.
- Kipp M, van der Star B, Vogel DY, Puentes F, van der Valk P, Baker D and Amor S (2012) Experimental in vivo and in vitro models of multiple sclerosis: EAE and beyond. *Mult Scler Relat Disord* **1**:15-28.
- Lefrancais E, Duval A, Mirey E, Roga S, Espinosa E, Cayrol C and Girard JP (2014) Central domain of IL-33 is cleaved by mast cell proteases for potent activation of group-2 innate lymphoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**:15502-15507.
- Lefrancais E, Roga S, Gautier V, Gonzalez-de-Peredo A, Monsarrat B, Girard JP and Cayrol C (2012) IL-33 is processed into mature bioactive forms by neutrophil elastase and cathepsin G. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**:1673-1678.
- Li M, Li Y, Liu X, Gao X and Wang Y (2012) IL-33 blockade suppresses the development of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. *J Neuroimmunol* **247**:25-31.
- Link H (1998) The cytokine storm in multiple sclerosis. *Mult Scler* **4**:12-15.
- Lublin FD (2005) Clinical features and diagnosis of multiple sclerosis. *Neurol Clin* **23**:1-15, v.
- Luo C, Jian C, Liao Y, Huang Q, Wu Y, Liu X and Zou D (2017) The role of microglia in multiple sclerosis. *Neuropsychiatr Dis Treat* **13**:1661-1667.
- Miller SD, Karpus WJ and Davidson TS (2007) Experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse. *Curr Protoc Immunol* **Chapter 15**:Unit 15 11.
- Milovanovic M, Volarevic V, Ljubic B, Radosavljevic G, Jovanovic I, Arsenijevic N and Lukic ML (2012) Deletion of IL-33R (ST2) abrogates resistance to EAE in BALB/C

- mice by enhancing polarization of APC to inflammatory phenotype. *PLoS One* **7**:e45225.
- Mincu RI, Magda SL, Mihaila S, Florescu M, Mihalcea DJ, Velcea A, Chiru A, Tiu C, Popescu BO, Cinteza M and Vinereanu D (2018) Impaired Cardiac Function in Patients with Multiple Sclerosis by Comparison with Normal Subjects. *Sci Rep* **8**:3300.
- Moore JE, 3rd and James GW, 3rd (1953) A simple direct method for absolute basophil leucocyte count. *Proc Soc Exp Biol Med* **82**:601-603.
- MSSStudyGroup, Group TLMSS and Group TUoBCMMA (1999) TNF neutralization in MS: results of a randomized, placebo-controlled multicenter study. The Lenercept Multiple Sclerosis Study Group and The University of British Columbia MS/MRI Analysis Group. *Neurology* **53**:457-465.
- Nomura K, Kojima T, Fuchimoto J, Obata K, Keira T, Himi T and Sawada N (2012) Regulation of interleukin-33 and thymic stromal lymphopoietin in human nasal fibroblasts by proinflammatory cytokines. *Laryngoscope* **122**:1185-1192.
- Odoardi F, Sie C, Streyl K, Ulaganathan VK, Schlager C, Lodygin D, Heckelsmiller K, Nietfeld W, Ellwart J, Klinkert WE, Lottaz C, Nosov M, Brinkmann V, Spang R, Lehrach H, Vingron M, Wekerle H, Flugel-Koch C and Flugel A (2012) T cells become licensed in the lung to enter the central nervous system. *Nature* **488**:675-679.
- Pache M, Kaiser HJ, Akhalbedashvili N, Lienert C, Dubler B, Kappos L and Flammer J (2003) Extraocular blood flow and endothelin-1 plasma levels in patients with multiple sclerosis. *Eur Neurol* **49**:164-168.
- Park IH, Park JH, Shin JM and Lee HM (2016) Tumor necrosis factor-alpha regulates interleukin-33 expression through extracellular signal-regulated kinase, p38, and nuclear factor-kappaB pathways in airway epithelial cells. *Int Forum Allergy Rhinol* **6**:973-980.
- Petrie MC, Padmanabhan N, McDonald JE, Hillier C, Connell JM and McMurray JJ (2001) Angiotensin converting enzyme (ACE) and non-ACE dependent angiotensin II generation in resistance arteries from patients with heart failure and coronary heart disease. *J Am Coll Cardiol* **37**:1056-1061.

- Piliponsky AM, Chen CC, Rios EJ, Treuting PM, Lahiri A, Abrink M, Pejler G, Tsai M and Galli SJ (2012) The chymase mouse mast cell protease 4 degrades TNF, limits inflammation, and promotes survival in a model of sepsis. *Am J Pathol* **181**:875-886.
- Ponath G, Park C and Pitt D (2018) The Role of Astrocytes in Multiple Sclerosis. *Front Immunol* **9**:217.
- Poulat P, D'Orleans-Juste P, de Champlain J, Yano M and Couture R (1994) Cardiovascular effects of intrathecally administered endothelins and big endothelin-1 in conscious rats: receptor characterization and mechanism of action. *Brain Res* **648**:239-248.
- Probert L (2015) TNF and its receptors in the CNS: The essential, the desirable and the deleterious effects. *Neuroscience* **302**:2-22.
- Roy A, Ganesh G, Sippola H, Bolin S, Sawesi O, Dagalv A, Schlenner SM, Feyerabend T, Rodewald HR, Kjellen L, Hellman L and Abrink M (2014) Mast cell chymase degrades the alarmins heat shock protein 70, biglycan, HMGB1, and interleukin-33 (IL-33) and limits danger-induced inflammation. *J Biol Chem* **289**:237-250.
- Secor VH, Secor WE, Gutekunst CA and Brown MA (2000) Mast cells are essential for early onset and severe disease in a murine model of multiple sclerosis. *J Exp Med* **191**:813-822.
- Semaan W, Desbiens L, Houde M, Labonte J, Gagnon H, Yamamoto D, Takai S, Laidlaw T, Bkaily G, Schwertani A, Pejler G, Levesque C, Desjardins R, Day R and D'Orleans-Juste P (2015) Chymase inhibitor-sensitive synthesis of endothelin-1 (1-31) by recombinant mouse mast cell protease 4 and human chymase. *Biochem Pharmacol* **94**:91-100.
- Shin T, Kang B, Tanuma N, Matsumoto Y, Wie M, Ahn M and Kang J (2001) Intrathecal administration of endothelin-1 receptor antagonist ameliorates autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats. *Neuroreport* **12**:1465-1468.
- Simard E, Jin D, Takai S, Miyazaki M, Brochu I and D'Orleans-Juste P (2009) Chymase-dependent conversion of Big endothelin-1 in the mouse in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* **328**:540-548.
- Tanzola MB, Robbie-Ryan M, Gutekunst CA and Brown MA (2003) Mast cells exert effects outside the central nervous system to influence experimental allergic encephalomyelitis disease course. *J Immunol* **171**:4385-4391.

- Tchougounova E, Pejler G and Abrink M (2003) The chymase, mouse mast cell protease 4, constitutes the major chymotrypsin-like activity in peritoneum and ear tissue. A role for mouse mast cell protease 4 in thrombin regulation and fibronectin turnover. *J Exp Med* **198**:423-431.
- van Oosten BW, Barkhof F, Truyen L, Boringa JB, Bertelsmann FW, von Blomberg BM, Woody JN, Hartung HP and Polman CH (1996) Increased MRI activity and immune activation in two multiple sclerosis patients treated with the monoclonal anti-tumor necrosis factor antibody cA2. *Neurology* **47**:1531-1534.
- Waern I, Lundequist A, Pejler G and Wernersson S (2013) Mast cell chymase modulates IL-33 levels and controls allergic sensitization in dust-mite induced airway inflammation. *Mucosal Immunol* **6**:911-920.
- Xiao Y, Lai L, Chen H, Shi J, Zeng F, Li J, Feng H, Mao J, Zhang F, Wu N, Xu Y, Tan Z, Gong F and Zheng F (2018) Interleukin-33 deficiency exacerbated experimental autoimmune encephalomyelitis with an influence on immune cells and glia cells. *Mol Immunol* **101**:550-563.



## **14. DISCUSSION**

### **14.1 Résumé des principaux résultats**

Essentiellement, les deux études présentées dans cette thèse suggèrent que la délétion génétique de la mMCP-4 chez la souris permet de retarder l'apparition des premiers symptômes cliniques de l'EAE. On observe, chez ces souris, un niveau de myéline basal supérieur à celui des souris de type sauvage qui demeure plus élevé 1 semaine post-EAE et une activation microgliale et astrogliale moindre dans la matière grise à 2 semaines post-immunisation. De plus, durant la phase préclinique, c'est-à-dire à la première semaine suivant l'immunisation des souris en EAE, on observe une élévation des niveaux d'expression de l'ARNm de la mMCP-4 chez les souris de type sauvage qui s'accompagne d'une augmentation des niveaux d'ET-1 immunoréactive et d'une augmentation de l'activité fonctionnelle de la chymase *in vivo* chez la souris consciente. Ces augmentations ne sont pas observées chez les souris mMCP-4 KO. Par contre, il a été possible de mesurer une quantité relative plus importante de l'expression de l'ARNm pulmonaire de la prépro-ET-1 et de l'IL-33 chez les souris mMCP-4 KO, alors que ces niveaux d'expression demeurent stables dans le cerveau et chez les souris de type sauvage.

### **14.2 Validation de l'hypothèse principale**

Nous avons posé comme hypothèse de travail que la chymase mMCP-4 joue un rôle délétère dans le développement de la pathologie dans le modèle de souris de SEP. En effet comme mentionné précédemment, la délétion génique de la mMCP-4 chez la souris permet de retarder l'apparition des premiers signes cliniques de l'EAE s'accompagnant d'effets protecteurs sur la myéline et une réduction de l'astrogliose et de la microgliose normalement observées dans ce modèle animal. De même, les résultats obtenus par l'administration exogène de big-ET-1 chez les souris conscientes nous ont permis de voir que l'activité chymase était plus importante suite à l'induction de l'EAE.

### 14.3 Originalité de cette étude

Les travaux réalisés pour cette thèse se distinguent de ce que l'on trouve dans la littérature par le fait d'abord que nous avons utilisé un modèle de souris pour lequel une seule enzyme mastocytaire a été supprimée plutôt que la totalité du type cellulaire. Des résultats contradictoires ont pu être obtenus chez les différents modèles de souris dont les mastocytes ont été délétés. Comme mentionné dans l'introduction, il n'existe pas de pathologie reconnue chez l'Homme pour laquelle nous observons une disparition complète d'un type cellulaire comme les mastocytes (Ribatti, 2015). De ce fait, les résultats présentés dans la présente étude deviennent plus facilement transposables à une situation clinique. De plus, les mastocytes contiennent une pléthore de médiateurs préformés, la délétion mastocytaire ne nous permet pas de cibler le rôle spécifique des uns par rapport aux autres dans une condition pathologique complexe comme l'EAE. D'autant plus que d'autres études ont rapporté un rôle et une augmentation de l'expression de certains médiateurs, comme l'histamine et la tryptase, en SEP (Rozniecki, *et al.*, 1995; Theoharides, *et al.*, 2007; Kallweit, *et al.*, 2013). Notre modèle de souris mMCP-4 KO nous permet de voir l'effet spécifique d'une seule enzyme mastocytaire sur la pathophysiologie.

Ensuite l'utilisation d'une technique nous permettant d'étudier les paramètres hémodynamiques des souris conscientes, et complètement libres de mouvement, combinée à la possibilité de faire des administrations centrales d'agents vasoactifs sans chirurgie ni anesthésie chez ces souris est relativement nouveau. Ainsi la radio-télémétrie nous permet de suivre sur une période plus ou moins longue, selon le modèle de conception de l'étude, les paramètres hémodynamiques des souris conscientes. On sait que la plupart des agents anesthésiants ont des effets cardio-dépresseurs plus ou moins importants (Bazin, *et al.*, 2004; Janssen, *et al.*, 2004). De plus, les anesthésiques peuvent avoir un impact direct de par leur mécanisme d'action. Nous pouvons prendre l'exemple du mélange de kétamine/xylazine régulièrement employé en recherche préclinique pour rendre plus tangible l'idée exprimée ici. La kétamine est un antagoniste des récepteurs NMDA (Anis, *et al.*, 1983) et la xylazine est un agoniste  $\alpha$ -adrénergique (Bazin, *et al.*, 2004). L'inhibition ou l'activation de ces récepteurs pourrait avoir des interactions croisées ou des effets antagonistes ou synergiques imprévus ou inconnus avec d'autres systèmes réceptoriels à l'étude. Ainsi l'utilisation de la

radio-télémétrie nous permet de limiter ces effets non-désirés qu'implique l'utilisation d'agents anesthésiques tout en nous permettant d'étudier les effets hémodynamiques dans un système complètement fonctionnel. Nous avons d'ailleurs réalisé une étude comparative de la réponse pressive à l'ET-1 chez la souris de type C57Bl/6 consciente, par la technique de radio-télémétrie, et anesthésiée. Comme on peut le voir sur le graphique des résultats supplémentaires inclus à l'annexe 2, nous avons obtenu un décalage vers la gauche de la courbe dose-réponse des souris conscientes par rapport à celle des souris anesthésiées, soit 6 unités logarithmiques. Ainsi les doses effectrices médianes ( $ED_{50}$ ) calculées à partir de ces courbes doses-réponses sont donc de  $1.19 \pm 0.694$  fmol/kg chez les souris conscientes et de  $1.20 \pm 0.059$  nmol/kg chez les souris anesthésiées. On a pu constater que le profil temps-réponse chez les souris conscientes ressemble à ce que nous obtenons avec une dose équipotente chez les souris anesthésiées, soit une élévation rapide de la pression artérielle qui se maintient dans le temps (résultats non présentés). Nous avons donc basé notre choix de doses d'ET-1 et de son précurseur, la big-ET-1, à administrer par voie veineuse dans la seconde étude de cette thèse à partir de ce constat et de ce que nous avons utilisé dans une précédente étude (Semaan, *et al.*, 2015). Quant au choix des doses à administrer par voie centrale, n'ayant pas, à notre connaissance, d'études de référence chez la souris, nous nous sommes basés sur les doses que Poulat *et al.* ont administrées chez le rat tout en considérant les effets toxiques de l'ET-1 rapportés dans cette étude (Poulat, *et al.*, 1994). Par ailleurs, au cours de la seconde étude faisant partie intégrante de cette thèse, les doses d'ET-1 ou de big-ET-1 employées n'ont pas provoqué d'effets toxiques suite à l'administration centrale ou systémique des peptides chez les souris conscientes instrumentées en radio-télémétrie. Comme il s'agit, à notre connaissance, de la première étude de ce type chez la souris, nous sommes les premiers à rapporter cette observation. Toutefois, l'utilisation de faibles doses avec une échelle très limitée ne nous permet pas de déterminer si des doses plus importantes d'ET-1 ou de son précurseur pourraient provoquer une toxicité chez la souris.

D'autre part, l'implantation de ce type d'appareil de mesure nous permet d'effectuer des expérimentations sur un nombre plus petit de souris. La radio-télémétrie permet également d'évaluer les changements qui s'opèrent chez une souris suivant l'enclenchement d'une pathologie telle l'EAE en étant son propre contrôle par rapport à son état sain. De même,

l'injection centrale sans implantation de cathéters permet de réduire les risques d'infection et de complications post-chirurgicales chez nos souris. De plus cette technique d'injection nous permet d'administrer nos peptides à plusieurs reprises sur une période plus ou moins longue. Cette façon de procéder à l'administration intrathécale nous permet également d'étudier les effets centraux sur le système cardiovasculaire de peptides qui ne possèdent pas les propriétés physico-chimiques leur permettant de traverser la BHE, comme c'est le cas pour l'ET-1. Nous pouvons ainsi comparer les effets cardiovasculaires attribués à notre peptide d'intérêt dans les deux compartiments, soit le SNC et le système systémique. Ce qui nous a également permis d'évaluer l'activité fonctionnelle d'une enzyme dans un modèle pathologique neuro-inflammatoire auto-immun. Des études précédentes ont d'ailleurs montré que des événements importants pour le développement de la pathologie à l'étude dans cet ouvrage se produisaient autant en périphérie qu'au niveau central. Selon la recension de la littérature réalisée dans le cadre de la préparation de cette thèse, c'est la première fois que l'administration d'un agoniste au niveau central à des fins d'étude de la réponse cardiovasculaire a été réalisée chez la souris.

#### 14.4 Effets de la délétion génétique de la mMCP-4 dans le développement de l'EAE

Des études ont montré que les médiateurs préformés contenus dans les granules de sécrétion de mastocytes ont diverses implications dans la physiopathologie de la SEP. L'histamine possède des effets vasodilatateurs, angiogéniques, mitogéniques et suppresseurs de l'activation des cellules T (Theoharides, *et al.*, 2007). Dans la SEP, les patients ont des niveaux 60% plus élevés d'histamine dans le liquide céphalo-rachidien que les individus non affectés par la maladie (Kallweit, *et al.*, 2013). La relâche d'histamine par les mastocytes contribue au changement de la perméabilité de la BHE (Lu, *et al.*, 2010), induit le roulement et l'adhésion des leucocytes (Bebo, *et al.*, 1996), stimule l'activation microgliale et inhibe la chimiotaxie et la phagocytose des cellules microgliales (Dong, *et al.*, 2014a; Iida, *et al.*, 2015; Cacabelos, *et al.*, 2016). L'enzyme mastocytaire tryptase a aussi été montrée augmentée dans le sérum, le liquide céphalo-rachidien et les tissus des patients SEP (Rozniecki, *et al.*, 1995). La chymase possède de nombreux substrats susceptibles

d'influencer le cours de la pathologie, comme des constituants des jonctions serrées de la BHE (Pejler, *et al.*, 2007), des enzymes ayant un effet sur la matrice extracellulaire comme la MMP-9 (Tchougounova, *et al.*, 2005), des cytokines comme le TNF- $\alpha$  (Piliponsky, *et al.*, 2012) et l'IL-33, pour laquelle l'action de la chymase permet une relâche extracellulaire sous une forme pleinement active et dont le rôle dans la SEP/EAE dépend de la phase pathologique à l'étude (De la Fuente, *et al.*, 2015; Martin et Martin, 2016; Travers, *et al.*, 2018) et la big-ET-1. Dans notre modèle d'EAE, la délétion génétique de la mMCP-4 supporte l'importance de cette enzyme en phase préclinique de l'EAE, c'est-à-dire avant l'apparition des premiers symptômes de la maladie. Selon nos résultats, la chymase semble être impliquée dans le pic d'ET-1 que l'on observe chez les souris de type sauvage une semaine après l'induction de l'EAE, moment pour lequel on mesure une augmentation de l'activité fonctionnelle de la mMCP-4 chez la souris consciente.

#### 14.5 Effets périphériques versus centraux

Dans une série de résultats que nous n'avons pas présentés dans les deux articles faisant partie intégrante de cette thèse, mais qui se retrouve à l'annexe 3, nous avons tenté de recréer l'effet du KO de la mMCP-4 par l'utilisation d'un inhibiteur spécifique des chymases, le TY-51469, administré par voie systémique (intrapéritonéale) et par voie centrale (intrathécale). Malheureusement, le traitement n'a pas produit les effets escomptés puisque nous n'avons pas observé de différences dans le développement des scores cliniques chez les souris traitées par rapport à celles ayant reçu le véhicule. Séquentiellement, nous avons d'abord procédé au traitement par voie i.p. et nous avons supposé que l'échec du traitement était attribuable aux propriétés physico-chimiques de la molécule qui ne lui permettaient pas de traverser la BHE, même si des évidences ont montré que l'intégrité de celle-ci est compromise dans le modèle de souris d'EAE (D'Haeseleer, *et al.*, 2011) et que les mastocytes retrouvés au niveau systémique peuvent influencer sur le cours du développement de l'EAE chez des souris déplétées en mastocytes dont seule les populations de cellules mastocytaires au niveau périphérique ont été restaurées par transfert de mastocytes dérivés de la moelle osseuse (*bone marrow-derived mast cells* : BMMCs) (Tanzola, *et al.*, 2003). Nous nous

sommes donc intéressés à l'effet du traitement avec le TY-51469 administré directement au niveau central par injection intrathécale. Ce traitement n'a pas non plus donné les résultats escomptés puisqu'il n'y a pas eu de différence dans les signes cliniques observés chez les souris traitées. Malgré tout, nous avons analysé l'impact des dommages myéliniques dans les moelles épinières lombaires par coloration au *luxol fast blue* et nous avons constaté que le traitement central permettait d'obtenir une plus grande coloration spécifique de la myéline, mais non le traitement par voie systémique. Ce résultat nous fait supposer que, contrairement à Tanzola et ses collègues (2013) avec son modèle déplété en mastocytes, l'activité de la chymase mastocytaire a de l'importance directement au niveau central. Par contre, les résultats obtenus avec l'administration de la big-ET-1 exogène chez la souris consciente nous montrent que l'augmentation de l'activité chymase fonctionnelle post-EAE n'est pas exclusive au SNC puisque nous mesurons une potentialisation de la réponse à la big-ET-1 administrée par voie veineuse au niveau périphérique. De plus, les seuls changements d'expression génique que nous avons mesurés dans la seconde étude de cette thèse ont été pour les gènes de la prépro-ET-1 et de l'IL-33 au niveau pulmonaire uniquement. Une étude récente a montré que, dans un modèle de rat d'EAE, les cellules T transférées par injection intraveineuse résidaient de façon transitoire au niveau du tissu pulmonaire (Odoardi, *et al.*, 2012). Ces cellules subissent alors des modifications dans leur schéma transcriptionnel en régulant à la baisse leurs programmes de prolifération et d'activation immunitaire et à la hausse les programmes responsables de la motilité et de l'adhésion cellulaire. Ainsi, ces cellules T deviennent plus réactives vis-à-vis les stimuli chimioattractants que l'on retrouve en phase préclinique de leur modèle d'EAE et ont une capacité augmentée à transgresser les barrières endothéliales comme la BHE au niveau du SNC avant même que celle-ci subisse des dommages compromettant son intégrité et la rendant plus perméable. Puis peu avant l'apparition des premiers symptômes cliniques, ces cellules T envahissent le SNC avant d'y être réactivées et d'y produire les événements physiopathologiques reconnus (Odoardi, *et al.*, 2012). Les phénomènes décrits par Odoardi *et al.* pourraient être une piste mécanistique pour expliquer l'impact protecteur de la délétion génique de la mMCP-4 que l'on retrouve en phase préclinique de notre modèle d'EAE chez la souris et l'impact des changements d'expression génique de l'IL-33 et de la prépro-ET-1 pulmonaire observés dans la seconde

étude. Toutefois, de plus amples expérimentations pour explorer cette hypothèse devront être poursuivies.

#### 14.6 Rôle de l'IL-33 dans notre modèle

Il est connu que l'IL-33 permet une polarisation des macrophages vers un type M2, de même que pour les cellules microgliales dans le SNC (Kurowska-Stolarska, *et al.*, 2009). Aussi l'IL-33 facilite la différenciation des cellules Th2 et Treg qui sont deux types cellulaires bénéfiques dans la SEP/EAE (Jiang, *et al.*, 2012; Milovanovic, *et al.*, 2012; Chen, *et al.*, 2015; Peine, *et al.*, 2016; Xiao, *et al.*, 2018). Chez nos souris mMCP-4 KO saines, on observe une plus grande expression de l'IL-33 pulmonaire et une augmentation de cette expression 1 semaine post-EAE. Dans le même temps, on voit un retard dans l'apparition des premiers signes cliniques, lorsque comparé avec les souris de type sauvage et également une plus grande quantité de myéline au niveau des moelles épinières lombaires quantifiées par coloration au *luxol fast blue*. Des résultats non présentés dans le second article nous ont également permis de montrer que l'expression de l'IL-33 chez les souris mMCP-4 KO soumises à l'EAE pour 2 semaines diminuait à un niveau semblable à ce que l'on retrouve chez les souris de type sauvage. Cette diminution se produit à un moment où les scores cliniques des souris génétiquement réprimées commencent à « rattraper » les souris de type sauvage, comme on peut voir dans la figure 1 du premier papier. Cette diminution concorde également avec le moment où nous n'observons plus de différences dans les quantités de myéline au niveau des moelles épinières lombaires quantifiées par histologie à l'aide du *luxol fast blue* (figures 5 et 6 du papier publié dans *Mediators of Inflammation* en 2016). Ce qui pourrait démontrer un rôle périphérique des mastocytes, et plus particulièrement de la mMCP-4, dans le modèle murin d'EAE en ce qui a trait à la mobilisation des cellules T à la reconnaissance de la myéline dans les organes lymphoïdes secondaires tout comme l'avait montré Tanzola *et al.* (Tanzola, *et al.*, 2003).

## 14.7 Rôle du TNF- $\alpha$ dans notre modèle

De nombreuses cytokines, la plupart pro-inflammatoires, ont été montrées dans l'étiologie de la SEP ainsi que ses différents modèles animaux regroupés sous l'appellation EAE (Palle, *et al.*, 2017). Parmi celles-ci on retrouve le TNF- $\alpha$ . Pourtant l'utilisation de bloqueurs de TNF- $\alpha$  dans le traitement de la SEP s'est avérée délétère (van Oosten, *et al.*, 1996; MSSStudyGroup, *et al.*, 1999; Titelbaum, *et al.*, 2005; Alnasser Alsukhni, *et al.*, 2016). Des hypothèses pour expliquer l'échec de ce traitement ont été posées, dont les différentes voies de signalisation activées par le récepteur TNFR2 qui mènent à des événements cellulaires bénéfiques dans le cas de la SEP comme la remyélinisation et la survie neuronale tel que discuté en introduction de cette thèse (Kallioli et Ivashkiv, 2016). Une nouvelle hypothèse que l'on pourrait poser serait l'augmentation de l'expression d'une autre cytokine, l'IL-33, par des voies de signalisation impliquant des MAPK et le NF- $\kappa$ B (Nomura, *et al.*, 2012; Balato, *et al.*, 2014; Park, *et al.*, 2016). Comme vu dans l'introduction et dans la section précédente, l'IL-33 a aussi été montrée pour avoir des rôles bénéfiques dans la physiopathologie, dont la polarisation des cellules microgliales vers un type M2 et la différenciation des cellules T pour augmenter la balance des cellules T vers des types Th2/Treg qui se trouvent être protecteurs dans la SEP contrairement aux cellules T de types Th1/Th17. Il s'est avéré que nous avons pu mesurer le TNF- $\alpha$  sérique dans les groupes de souris ayant montré des niveaux d'expression d'ARNm de l'IL-33 plus élevés, soit chez les souris mMCP-4 KO. Par ailleurs, cette enzyme a été récemment montrée pour dégrader le TNF- $\alpha$  (Piliponsky, *et al.*, 2012), ainsi la délétion génétique de la mMCP-4 dans notre modèle peut expliquer que nous sommes en mesure de quantifier du TNF- $\alpha$  chez nos souris KO saines, mais pas chez nos souris de type sauvages. Puis dans une situation inflammatoire comme l'EAE, les niveaux de TNF- $\alpha$  sont augmentés, ainsi donc nous sommes en mesure de quantifier cette cytokine au niveau sérique chez les souris de type sauvage, mais de façon encore plus marquée chez nos souris mMCP-4 KO soumise à l'EAE.

Ainsi notre hypothèse mécanistique pour expliquer l'effet protecteur de la délétion génétique de la mMCP-4 serait que chez ces souris, il se produit moins de dégradation du TNF- $\alpha$ . Ainsi, cette cytokine peut agir sur son récepteur TNFR2 pour mener à des événements cellulaires bénéfiques au moment de l'immunisation des souris EAE, mais



également agir directement sur l'expression de l'IL-33 qui peut elle aussi mener à des évènements bénéfiques et retarder l'apparition des signes pathologiques chez nos souris mMCP-4 KO.

## 14.8 Comparatif des souris EAE délestées en mastocytes versus mMCP-4 KO

### 14.8.1 Avantages du KO

Les souris délestées en mastocytes de façon dépendante de l'expression de c-kit présentent toutes de nombreuses autres anomalies génétiques puisque ce récepteur n'est pas spécifique aux mastocytes alors qu'il est exprimé également par d'autres types cellulaires (Yu, *et al.*, 2015). Aussi la repopulation en mastocytes par l'administration de BMMC différencié par une culture avec de l'IL-3 et du *stem cell factor* (SCF) ne conduit pas à une distribution normale de mastocytes, fort probablement parce que la différenciation et la migration des cellules progénitrices nécessitent une induction par différents facteurs selon le tissu à coloniser (Tanzola, *et al.*, 2003). Les souris mMCP-4 KO ne démontrent aucune autre anomalie que la perte de l'activité de type chymotrypsine dans les mastocytes de type CTMC (Tchougounova, *et al.*, 2003). De plus, les mastocytes contiennent beaucoup de médiateurs préformés dans leurs granules et en produisent *de novo* plusieurs autres; il est donc difficile d'attribuer spécifiquement un effet observé à l'un d'eux en particulier en employant un modèle de souris déplétée en mastocytes. Alors que l'utilisation de souris KO pour une enzyme spécifique permet d'identifier le rôle spécifique de cette enzyme dans la pathologie. Finalement tel que présenté dans l'introduction de cette thèse, il n'y a pas de situation pathologique chez l'Homme pour laquelle tout un type cellulaire comme les mastocytes est absent. Ainsi il est extrêmement difficile de transposer les résultats issus d'études réalisées grâce à un modèle animal dont tout un type cellulaire a été délesté. Il existe par contre des mutations génétiques responsables d'un dysfonctionnement enzymatique qui mène au développement de pathologies neurodégénératives comme la superoxyde dismutase 1 (SOD1) dans la sclérose latérale amyotrophique (Kaur, *et al.*, 2016). Certaines mutations génétiques augmentent la susceptibilité de certains patients à développer la SEP (Sawcer, *et al.*, 2014). De plus la mutation génétique d'une enzyme se rapproche un peu plus de l'effet

de l'utilisation d'un inhibiteur en clinique. Par ailleurs, contrairement à l'Homme, la souris exprime plusieurs chymases dans les granules de sécrétion des mastocytes dont les mMCP-1, -2, -4 et -5 et les inhibiteurs de chymases ne sont pas spécifiques pour la chymase mMCP-4 qui se trouve être l'homologue murin de la chymase humaine en termes de localisation tissulaire et d'activité enzymatique (Tchougounova, *et al.*, 2003; Wu, *et al.*, 2005; Andersson, *et al.*, 2008).

#### 14.8.2 Limitation de la répression monogénique de la mMCP-4

L'une des limites de la délétion génétique d'une enzyme contenue dans les granules de sécrétion des mastocytes est l'impact que cela peut avoir sur l'ensemble du contenu granulaire. En effet des études ont montré que certaines mutations génétiques pouvaient entraîner des changements phénotypiques cellulaires, par exemple la délétion de la carboxypeptidase provoque une perte de la capacité des mastocytes à emmagasiner la mMCP-5 (Feyerabend, *et al.*, 2005; Pejler, *et al.*, 2007). De même une mutation pour l'enzyme histidine décarboxylase mène à la perte de l'expression de l'histamine dans les mastocytes (Ohtsu, *et al.*, 2001; Pejler, *et al.*, 2007) et une réduction de la serglycine dans les granules, ce faisant les mastocytes CTMC ne parviennent plus à emmagasiner les mMCP-4, -5, -6 et la carboxypeptidase A puisqu'il leur manque un constituant fort important dans le balancement des charges de leurs granules (Pejler, *et al.*, 2007). Ainsi il peut se produire des adaptations phénotypiques chez les souris subissant des mutations génétiques complètent d'un gène comme dans notre modèle mMCP-4. À notre connaissance toutefois, le KO de la mMCP-4 n'a pas montré d'autres phénotypes particuliers que la perte de l'activité de type chymotrypsine des mastocytes de type CTMC (Tchougounova, *et al.*, 2005).

#### 14.9 Avantages de mesurer l'activité chymase-dépendante chez la souris consciente saine et en EAE

Dans le second article présenté dans cette thèse, nous avons utilisé une approche par radio-télémétrie chez la souris consciente afin de mesurer l'activité fonctionnelle de la chymase dans notre modèle d'EAE. Le premier avantage de cette technique est la dose

d'agoniste à utiliser chez les souris conscientes pour obtenir une variation de la pression artérielle. En effet, nous avons déjà montré, dans un article paru en 2015, que la dose de big-ET-1 à administrer chez un animal conscient afin d'induire une réponse pressive équipotente à ce que nous avons précédemment obtenu chez la souris anesthésiée était beaucoup plus faible, soit dans l'ordre du picomolaire chez la souris consciente et dans l'ordre du nanomolaire chez la souris anesthésiée (Simard, *et al.*, 2009; Houde, *et al.*, 2013; Semaan, *et al.*, 2015). Comme l'ET-1 peut induire des effets toxiques (Maurer, *et al.*, 2004; Simard, *et al.*, 2009), l'utilisation de doses plus faibles et se rapprochant des concentrations physiologiques permet de limiter les effets indésirables. De plus, la radio-télémétrie nous permet de mesurer, sur une même souris, l'évolution des paramètres hémodynamiques pendant plusieurs jours sans que celle-ci subisse une quelconque limitation dans ses mouvements. Ainsi nous avons pu évaluer l'incidence de la pathologie à l'étude, soit l'EAE, sur les paramètres hémodynamiques basaux des souris. De plus, cette approche nous a également permis de mesurer la contribution de la mMCP-4 dans les variations hémodynamiques induites par l'administration exogène du précurseur de l'ET-1 et d'évaluer les changements de l'activité chymase qui s'opèrent suite à l'induction de l'EAE chez ces mêmes souris. Finalement, la technique d'administration par voie intrathécale, combinée à la radio-télémétrie, nous a permis d'étudier la contribution du SNA dans la réponse hémodynamique de l'ET-1. Puisque ce peptide et son précurseur, la big-ET-1, ne traversent pas la BHE (Mima, *et al.*, 1989; Kadel, *et al.*, 1990; Rubanyi et Polokoff, 1994) nous pouvons conclure que les variations de pression artérielle enregistrées après l'injection de l'agoniste au niveau central sont produites par un effet du peptide sur le SNA responsable du contrôle de la résistance périphérique et de la fonction cardiaque. Ce type d'étude avait été fait dans les années 1990 chez le rat conscient, mais à notre connaissance il s'agit de la première étude de ce genre chez la souris.

#### 14.10 Limites de la présente étude

Tel que mentionné précédemment, nous n'avons pas été en mesure de « recréer », à l'aide d'un inhibiteur pharmacologique chez nos souris de type sauvage, l'effet protecteur obtenu avec les souris mMCP-4 KO. Les résultats avec le *luxol fast blue* nous ont toutefois permis de démontrer que le TY-51469 administré directement au niveau central pouvait avoir un

impact sur la myéline spinale. Cette avenue thérapeutique pourrait être à reconsidérer suite à une optimisation du protocole de traitements ou de la molécule pharmacologique.

Présentement, nous avons évalué le rôle de la chymase dans l'EAE en tant que modèle neurodégénératif impliquant le système immunitaire dans des conditions inflammatoires. Il est toutefois connu que les mastocytes, de même que la chymase, sont très importants dans l'inflammation (Caughey, 2011; Dong, *et al.*, 2014b). Il serait pertinent de voir si les effets protecteurs du KO de la mMCP-4 mesurés dans ces études sont attribuables uniquement à l'inflammation par l'utilisation d'un modèle d'immunisation par adjuvant seul ou si l'activité chymase influe sur l'auto-immunité. Une importante limite concernant les deux études présentées dans cette thèse est que nous n'avons pas déterminé le profil des cellules immunitaires dans nos souris KO, autant à l'état sain que suite à l'induction de l'EAE. Une étude par cytométrie en flux nous aurait permis de voir s'il y a un changement dans le profil d'expression des cellules T bénéfiques versus délétères dans notre modèle (Th1/Th17 par rapport aux Th2/Treg).

De plus, certains des substrats de la chymase sont des composantes de la BHE (Pejler, *et al.*, 2007) et cette pathologie se caractérise par une altération de la BHE laissant donc pénétrer dans le SNC des constituants de la périphérie, comme les cellules T auto-réactives, pour lesquelles normalement elle est imperméable. Malgré la présence de nombreux substrats de chymase dans la BHE, nous n'avons pas évalué la perméabilité de cette dernière dans nos souris mMCP-4 KO soumises à l'EAE. Nous aurions également pu voir le profil des différentes protéines constituant les jonctions serrées par spectrométrie de masse ou par immunobuvardage de type western, afin d'étudier l'activité (ou pas) de la chymase sur ces protéines.

Pour le moment, nous avons regardé les niveaux d'expression uniquement de l'ARNm pour la chymase, les composantes du système endothélinergique et l'IL-33. Toutefois, il faut garder en tête que la variation de l'expression de l'ARNm ne signifie pas forcément que la protéine sera surexprimée. De plus l'expression de l'ARNm de l'IL-33 ne fournit pas d'informations concernant la forme de la protéine, à savoir de forme liée au noyau ou libre. Aussi il est intéressant de constater une augmentation de l'expression de l'IL-33 chez les

souris mMCP-4 KO qui présentent un décalage dans l'apparition des premiers symptômes par rapport aux souris de type sauvage, ce qui pourrait hypothétiquement être un des mécanismes expliquant la protection chez nos souris génétiquement modifiées. Tel que mentionné dans l'introduction de cette thèse, le récepteur ST2, en particulier sous forme libre sST2, est impliqué dans le contrôle de l'activité de cette cytokine. Les niveaux d'expression du récepteur ST2 membranaire ont aussi été mesurés à la hausse dans le SNC des patients atteints de SEP (Allan, *et al.*, 2016; Zandee, *et al.*, 2017). Nous n'avons toutefois pas fait de mesures de l'expression de ce récepteur au cours de nos expérimentations. L'axe IL-33/ST2 mériterait sans doute des études plus approfondies dans notre modèle animal étant donné que nous avons mesuré des variations particulièrement importantes chez nos souris mMCP-4 KO mais pas chez les souris de type sauvage pour l'ARNm de l'IL-33 et que les résultats parus dans la littérature concernant cet axe dans l'EAE sont contradictoires (Jiang, *et al.*, 2012; Li, *et al.*, 2012a; Milovanovic, *et al.*, 2012; Chen, *et al.*, 2015; Allan, *et al.*, 2016; Xiao, *et al.*, 2018).

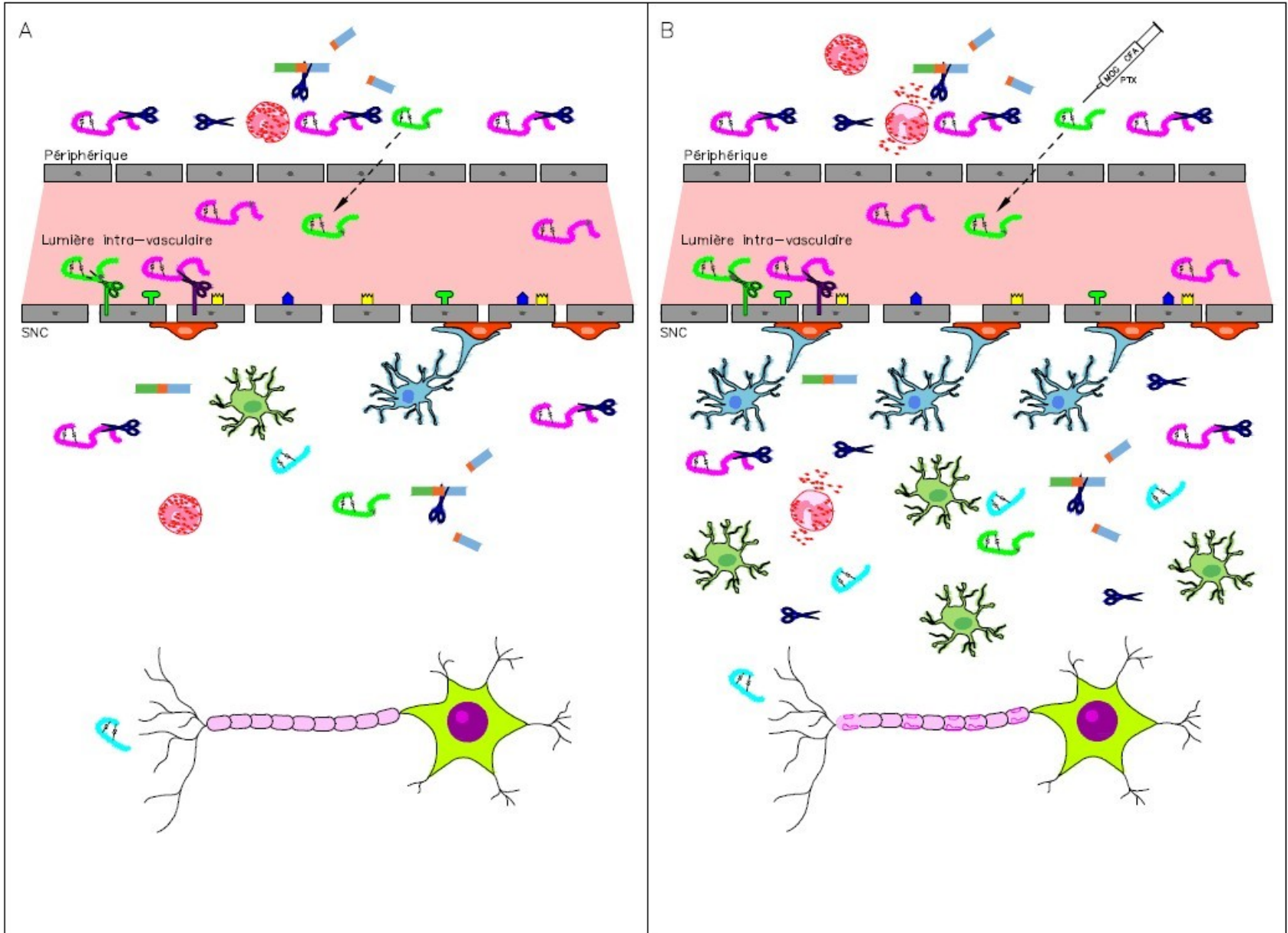
De plus, bien que nous ayons mesuré une réduction de l'astrogliose et de la microgliose en plus d'un niveau de myéline spinale plus élevé chez nos souris mMCP-4 KO, nous ne nous sommes pas intéressés aux dommages neuronaux, c'est-à-dire à l'intégrité des axones et des corps cellulaires des neurones. Bien que les effets bénéfiques observés chez les souris mMCP-4 KO sont particulièrement importants en phase précoce de la pathologie, il pourrait être intéressant de voir ce qui se produit dans une situation à plus long terme, par exemple au moment où l'on observe une neuro-dégénération. Nous aurions donc pu mesurer l'intégrité neuronale par immunohistochimie contre la *neuronal nuclear protein* (NeuN) un marqueur des corps cellulaires neuronaux et contre les neurofilaments (NF) un marqueur structurel des axones (Mullen, *et al.*, 1992; Meller, *et al.*, 1993; Trapp, *et al.*, 1998; Korzhevskii, *et al.*, 2009; Verdiev, *et al.*, 2009; Gusel'nikova et Korzhevskiy, 2015).

Finalement, l'étude sur la contribution du SNA dans la réponse pressive suivant l'administration intrathécale de big-ET-1 et d'ET-1 dans notre modèle aurait pu être confirmée par l'utilisation d'un antagoniste des récepteurs adrénergiques comme la phentolamine ou le prazosin. Comme mentionné dans l'introduction, une grande partie du contrôle autonome de la pression artérielle est imputable au système sympathique dont le

neurotransmetteur est la noradrénaline. Aussi, notre étude ayant été réalisée chez des souris femelles, il serait intéressant de voir si le contrôle autonome est moindre dans notre modèle puisque l'œstrogène réduit la vasoconstriction dépendante des récepteurs  $\alpha$ -adrénergiques chez l'Homme (Freedman, *et al.*, 1987; Barnes, 2017) et que la réponse centrale à l'ET-1 chez le rat s'accompagne d'une élévation des niveaux sériques de catécholamines (Ouchi, *et al.*, 1989; Macrae, *et al.*, 1991). L'utilisation unique de femelles dans les études de cette thèse peut être considérée comme une limitation. En effet, la SEP n'est pas une pathologie affectant uniquement les femmes. Aussi, le cycle menstruel des femelles peut, à certains égards, poser problème lors d'études animales. Toutefois dans le cas de l'EAE chez les souris de souche C57Bl/6, il n'y a pas de différences significatives entre les mâles et les femelles (Okuda, *et al.*, 2002; Papenfuss, *et al.*, 2004). Il est toutefois plus prudent d'utiliser le même genre pour l'ensemble de l'étude. Aussi, il est plus pratique d'employer les femelles puisque celles-ci présentent moins de problèmes d'agressivité entre elles et ne nécessitent pas d'être seule dans leur cage. Aussi, certains mâles peuvent présenter des prolapsus péniers lorsque la maladie est plus avancée, ce qui n'est pas un problème chez les femelles. Par ailleurs, en fonction des études sur la chymase chez la souris mâle précédemment effectuées dans le laboratoire, nous aurions probablement observé des résultats similaires chez des souris mâles, bien de que cette hypothèse doit être confirmée.

## **15. CONCLUSIONS GÉNÉRALES**

La chymase mastocytaire, mMCP-4, semble être impliquée dans la physiopathologie de l'EAE chez la souris, plus particulièrement en phase préclinique du développement de la maladie. L'augmentation de l'activité fonctionnelle de cette enzyme, que nous avons mesurée chez la souris consciente, semble indiquer que la chymase est impliquée dans les processus centraux et périphériques se produisant lors de l'initiation de la pathologie. Un schéma récapitulatif des observations présentées dans cette thèse se trouve à la Figure 31. De plus, les mécanismes protecteurs périphériques que nous avons mesurés chez nos souris mMCP-4 KO semblent avoir un lien avec l'axe IL-33/ST2, mais de plus amples expérimentations devront être effectuées afin de confirmer ou infirmer ces postulats mécanistiques.





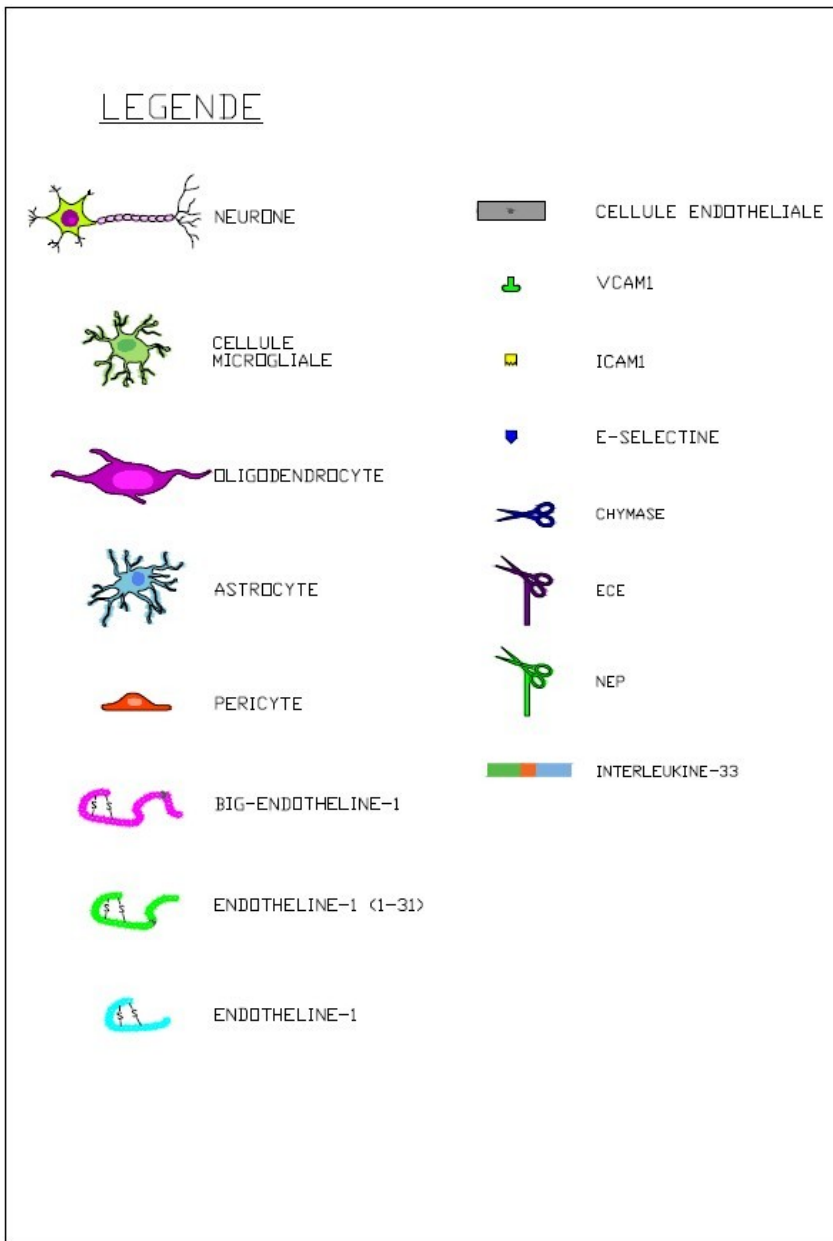


Figure 31 : Schéma récapitulatif de la thèse. La section A) représente une souris de type sauvage en conditions saines où l'on observe une activité chymase basale permettant une partie de la production d'ET-1 à partir de la big-ET-1 et une organisation cellulaire basale. La section B) illustre une souris de type sauvage suivant l'immunisation en EAE par l'utilisation d'une émulsion de MOG<sub>35-55</sub> et de CFA en combinaison avec l'administration de PTX. Suite à cette immunisation on trouve une augmentation de l'astroglie et de la microglie. De plus les mastocytes relâchent leur contenu granulaire, on mesure alors plus de chymase et plus d'ET-1. Nous n'avons pas observé de différences d'expression de l'ARNm de l'IL-33 chez ce type de souris, mais la littérature nous permet de poser d'hypothèse que nous devrions trouver une augmentation de niveau de la protéine ou de son récepteur. Par ailleurs, nous prévoyons effectuer ces dosages sous peu dans le but de répondre à certains commentaires reçus à ce propos par le journal. De plus, bien que non présenté dans ce schéma, nous observons une plus grande vasoconstriction des vaisseaux de résistance chez les souris conscientes en réponse à l'administration, tant en périphérie qu'au niveau central, de big-ET-1 suggérant une plus grande activité chymase suite à l'immunisation des souris en EAE.

## **16. PERSPECTIVES**

Il serait intéressant d'optimiser le traitement au TY-51469 administré par voie centrale, ou d'optimiser les propriétés physico-chimiques de la molécule afin de la rendre perméable à la BHE, afin de reproduire, à l'aide d'un inhibiteur pharmacologique, les résultats que nous avons observés chez nos souris mMCP-4 KO. Nous suggérons que l'utilisation d'une molécule inhibitrice pouvant traverser la BHE serait une meilleure avenue puisque des rôles potentiels ont été ciblés en périphérie et au niveau central dans notre modèle animal. De plus, le KO de la mMCP-4 n'est pas conditionnel. Ainsi tous les tissus sont exempts de cette enzyme chez nos souris. Ainsi pour un outil pharmacologique, cibler autant les mécanismes physiopathologiques se produisant au niveau systémique et central serait possiblement plus approprié dans cette pathologie où il semble se produire des événements importants dans les deux compartiments. À plus long terme pour une utilisation clinique thérapeutique, une administration d'une molécule par voie systémique est nettement plus avantageuse qu'une administration directe dans le SNC.

D'autre part, les résultats de quantification relative de l'ARNm de l'IL-33 semblent être prometteurs pour expliquer un rôle périphérique de la chymase mMCP-4 dans l'EAE. Toutefois, l'administration exogène de son récepteur ST2, et plus particulièrement sous sa forme soluble sST2, a été montrée comme étant bénéfique dans un modèle animal d'une pathologie auto-immune inflammatoire, l'arthrite rhumatoïde (Leung, *et al.*, 2004). Ainsi, l'étude plus approfondie de ce récepteur dans l'EAE pourrait mener à une nouvelle cible thérapeutique dans le futur.

Finalement, les deux études présentées dans cette thèse nous ont permis de montrer un rôle fonctionnel au niveau central et au niveau périphérique de la chymase dans la phase développementale de l'EAE. Nous n'avons toutefois pas été en mesure de montrer un mécanisme par lequel la mMCP-4 influence l'enclenchement de la pathologie chez la souris. Certaines hypothèses peuvent être posées, par exemple via la maturation de l'ET-1, la modification de la perméabilité de la BHE, la modification du profil de cytokines comme par maturation d'une forme libre plus active de l'IL-33 menant à des sous-populations de

cellules T dont la balance penche vers une neuro-protection ou directement en influençant l'inflammation ou les mécanismes de re-myélinisation.

## **17. LISTE DES RÉFÉRENCES**

- ABDOLAH M., YAVARI, P., HONARVAR, N. M., BITARAFAN, S., MAHMOUDI, M. et SABOOR-YARAGHI, A. A. (2015) Molecular Mechanisms of the Action of Vitamin A in Th17/Treg Axis in Multiple Sclerosis. *J Mol Neurosci* 57 (4): 605-613.
- ABSINTA M., SATI, P. et REICH, D. S. (2016) Advanced MRI and staging of multiple sclerosis lesions. *Nat Rev Neurol* 12 (6): 358-368.
- AGGARWAL S., YURLOVA, L., SNAIDERO, N., REETZ, C., FREY, S., ZIMMERMANN, J., PAHLER, G., JANSHOFF, A., FRIEDRICHS, J., MULLER, D. J., GOEBEL, C. et SIMONS, M. (2011) A size barrier limits protein diffusion at the cell surface to generate lipid-rich myelin-membrane sheets. *Dev Cell* 21 (3): 445-456.
- AGGARWAL S., SNAIDERO, N., PAHLER, G., FREY, S., SANCHEZ, P., ZWECKSTETTER, M., JANSHOFF, A., SCHNEIDER, A., WEIL, M. T., SCHAAP, I. A., GORLICH, D. et SIMONS, M. (2013) Myelin membrane assembly is driven by a phase transition of myelin basic proteins into a cohesive protein meshwork. *PLoS Biol* 11 (6): e1001577.
- AINGER K., AVOSSA, D., MORGAN, F., HILL, S. J., BARRY, C., BARBARESE, E. et CARSON, J. H. (1993) Transport and localization of exogenous myelin basic protein mRNA microinjected into oligodendrocytes. *J Cell Biol* 123 (2): 431-441.
- ALI M., ZHANG, G., THOMAS, W. R., MCLEAN, C. J., BIZZINTINO, J. A., LAING, I. A., MARTIN, A. C., GOLDBLATT, J., LE SOUEF, P. N. et HAYDEN, C. M. (2009) Investigations into the role of ST2 in acute asthma in children. *Tissue Antigens* 73 (3): 206-212.
- ALI S., NGUYEN, D. Q., FALK, W. et MARTIN, M. U. (2010) Caspase 3 inactivates biologically active full length interleukin-33 as a classical cytokine but does not prohibit nuclear translocation. *Biochem Biophys Res Commun* 391 (3): 1512-1516.
- ALI S., MOHS, A., THOMAS, M., KLARE, J., ROSS, R., SCHMITZ, M. L. et MARTIN, M. U. (2011) The dual function cytokine IL-33 interacts with the transcription factor NF-kappaB to dampen NF-kappaB-stimulated gene transcription. *J Immunol* 187 (4): 1609-1616.
- ALLAN D., FAIRLIE-CLARKE, K. J., ELLIOTT, C., SCHUH, C., BARNETT, S. C., LASSMANN, H., LINNINGTON, C. et JIANG, H. R. (2016) Role of IL-33 and ST2 signalling pathway in multiple sclerosis: expression by oligodendrocytes and inhibition of myelination in central nervous system. *Acta Neuropathol Commun* 4 (1): 75.
- ALNASSER ALSUKHNI R., JRIEKH, Z. et ABORAS, Y. (2016) Adalimumab Induced or Provoked MS in Patient with Autoimmune Uveitis: A Case Report and Review of the Literature. *Case Rep Med* 2016 1423131.
- ALOISI F. (2001) Immune function of microglia. *Glia* 36 (2): 165-179.

- ALSAHEBFOSOUL F., RAHIMMANESH, I., SHAJARIAN, M., ETEMADIFAR, M., SEDAGHAT, N., HEJAZI, Z. et NADERI, S. (2017) Interleukin-33 plasma levels in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Biomol Concepts* 8 (1): 55-60.
- ALVAREZ J. I., DODELET-DEVILLERS, A., KEBIR, H., IFERGAN, I., FABRE, P. J., TEROUZ, S., SABBAGH, M., WOSIK, K., BOURBONNIERE, L., BERNARD, M., VAN HORSSSEN, J., DE VRIES, H. E., CHARRON, F. et PRAT, A. (2011) The Hedgehog pathway promotes blood-brain barrier integrity and CNS immune quiescence. *Science* 334 (6063): 1727-1731.
- ANDERSSON M. K., KARLSON, U. et HELLMAN, L. (2008) The extended cleavage specificity of the rodent beta-chymases rMCP-1 and mMCP-4 reveal major functional similarities to the human mast cell chymase. *Mol Immunol* 45 (3): 766-775.
- ANIS N. A., BERRY, S. C., BURTON, N. R. et LODGE, D. (1983) The dissociative anaesthetics, ketamine and phencyclidine, selectively reduce excitation of central mammalian neurones by N-methyl-aspartate. *Br J Pharmacol* 79 (2): 565-575.
- ARAI H., HORI, S., ARAMORI, I., OHKUBO, H. et NAKANISHI, S. (1990) Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature* 348 (6303): 730-732.
- ARINAMI T., ISHIKAWA, M., INOUE, A., YANAGISAWA, M., MASAKI, T., YOSHIDA, M. C. et HAMAGUCHI, H. (1991) Chromosomal assignments of the human endothelin family genes: the endothelin-1 gene (EDN1) to 6p23-p24, the endothelin-2 gene (EDN2) to 1p34, and the endothelin-3 gene (EDN3) to 20q13.2-q13.3. *Am J Hum Genet* 48 (5): 990-996.
- ARMENDARIZ B. G., BRIBIAN, A., PEREZ-MARTINEZ, E., MARTINEZ, A., DE CASTRO, F., SORIANO, E. et BURGAYA, F. (2012) Expression of Semaphorin 4F in neurons and brain oligodendrocytes and the regulation of oligodendrocyte precursor migration in the optic nerve. *Mol Cell Neurosci* 49 (1): 54-67.
- ARNETT H. A., MASON, J., MARINO, M., SUZUKI, K., MATSUSHIMA, G. K. et TING, J. P. (2001) TNF alpha promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination. *Nat Neurosci* 4 (11): 1116-1122.
- ARNOLD T. et BETSHOLTZ, C. (2013) The importance of microglia in the development of the vasculature in the central nervous system. *Vasc Cell* 5 (1): 4.
- ARPAIA N., GREEN, J. A., MOLTEDO, B., ARVEY, A., HEMMERS, S., YUAN, S., TREUTING, P. M. et RUDENSKY, A. Y. (2015) A Distinct Function of Regulatory T Cells in Tissue Protection. *Cell* 162 (5): 1078-1089.
- ASCHERIO A. et MUNCH, M. (2000) Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. *Epidemiology* 11 (2): 220-224.

- ASCHERIO A. et MUNGER, K. L. (2007a) Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection. *Ann Neurol* 61 (4): 288-299.
- ASCHERIO A. et MUNGER, K. L. (2007b) Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part II: Noninfectious factors. *Ann Neurol* 61 (6): 504-513.
- ASHWELL K. (1990) Microglia and cell death in the developing mouse cerebellum. *Brain Res Dev Brain Res* 55 (2): 219-230.
- ATTINA T., CAMIDGE, R., NEWBY, D. E. et WEBB, D. J. (2005) Endothelin antagonism in pulmonary hypertension, heart failure, and beyond. *Heart* 91 (6): 825-831.
- BACHSTETTER A. D., MORGANTI, J. M., JERNBERG, J., SCHLUNK, A., MITCHELL, S. H., BREWSTER, K. W., HUDSON, C. E., COLE, M. J., HARRISON, J. K., BICKFORD, P. C. et GEMMA, C. (2011) Fractalkine and CX 3 CR1 regulate hippocampal neurogenesis in adult and aged rats. *Neurobiol Aging* 32 (11): 2030-2044.
- BAEKKEVOLD E. S., ROUSSIGNE, M., YAMANAKA, T., JOHANSEN, F. E., JAHNSEN, F. L., AMALRIC, F., BRANDTZAEG, P., ERARD, M., HARALDSEN, G. et GIRARD, J. P. (2003) Molecular characterization of NF-HEV, a nuclear factor preferentially expressed in human high endothelial venules. *Am J Pathol* 163 (1): 69-79.
- BAJWA E. K., MEBAZAA, A. et JANUZZI, J. L. (2015) ST2 in Pulmonary Disease. *Am J Cardiol* 115 (7 Suppl): 44B-47B.
- BAKHTI M., AGGARWAL, S. et SIMONS, M. (2014) Myelin architecture: zippering membranes tightly together. *Cell Mol Life Sci* 71 (7): 1265-1277.
- BALATO A., DI CAPRIO, R., CANTA, L., MATTII, M., LEMBO, S., RAIMONDO, A., SCHIATTARELLA, M., BALATO, N. et AYALA, F. (2014) IL-33 is regulated by TNF-alpha in normal and psoriatic skin. *Arch Dermatol Res* 306 (3): 299-304.
- BANASIK J. L., HOSICK, H., WRIGHT, J. W. et HARDING, J. W. (1991) Endothelin binding in brain of normotensive and spontaneously hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther* 257 (1): 302-306.
- BARNES J. N. (2017) Sex-specific factors regulating pressure and flow. *Exp Physiol* 102 (11): 1385-1392.
- BARON W., OZGEN, H., KLUNDER, B., DE JONGE, J. C., NOMDEN, A., PLAT, A., TRIFILIEFF, E., DE VRIES, H. et HOEKSTRA, D. (2015) The major myelin-resident protein PLP is transported to myelin membranes via a transcytotic mechanism: involvement of sulfatide. *Mol Cell Biol* 35 (1): 288-302.
- BAR-OR A., FAWAZ, L., FAN, B., DARLINGTON, P. J., RIEGER, A., GHORAYEB, C., CALABRESI, P. A., WAUBANT, E., HAUSER, S. L., ZHANG, J. et SMITH, C. H. (2010) Abnormal B-

- cell cytokine responses a trigger of T-cell-mediated disease in MS? *Ann Neurol* 67 (4): 452-461.
- BARR T. A., SHEN, P., BROWN, S., LAMPROPOULOU, V., ROCH, T., LAWRIE, S., FAN, B., O'CONNOR, R. A., ANDERTON, S. M., BAR-OR, A., FILLATREAU, S. et GRAY, D. (2012) B cell depletion therapy ameliorates autoimmune disease through ablation of IL-6-producing B cells. *J Exp Med* 209 (5): 1001-1010.
- BATCHELOR P. E., LIBERATORE, G. T., WONG, J. Y., PORRITT, M. J., FRERICHs, F., DONNAN, G. A. et HOWELLS, D. W. (1999) Activated macrophages and microglia induce dopaminergic sprouting in the injured striatum and express brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor. *J Neurosci* 19 (5): 1708-1716.
- BAUER B., HARTZ, A. M. et MILLER, D. S. (2007) Tumor necrosis factor alpha and endothelin-1 increase P-glycoprotein expression and transport activity at the blood-brain barrier. *Mol Pharmacol* 71 (3): 667-675.
- BAUFELD C., OSTERLOH, A., PROKOP, S., MILLER, K. R. et HEPPNER, F. L. (2016) High-fat diet-induced brain region-specific phenotypic spectrum of CNS resident microglia. *Acta Neuropathol* 132 (3): 361-375.
- BAYNASH A. G., HOSODA, K., GIAID, A., RICHARDSON, J. A., EMOTO, N., HAMMER, R. E. et YANAGISAWA, M. (1994) Interaction of endothelin-3 with endothelin-B receptor is essential for development of epidermal melanocytes and enteric neurons. *Cell* 79 (7): 1277-1285.
- BAZIN J. E., CONSTANTIN, J. M. et GINDRE, G. (2004) [Laboratory animal anaesthesia: influence of anaesthetic protocols on experimental models]. *Ann Fr Anesth Reanim* 23 (8): 811-818.
- BEBO B. F., JR., YONG, T., ORR, E. L. et LINTHICUM, D. S. (1996) Hypothesis: a possible role for mast cells and their inflammatory mediators in the pathogenesis of autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci Res* 45 (4): 340-348.
- BELTRAN C. J., NUNEZ, L. E., DIAZ-JIMENEZ, D., FARFAN, N., CANDIA, E., HEINE, C., LOPEZ, F., GONZALEZ, M. J., QUERA, R. et HERMOSO, M. A. (2010) Characterization of the novel ST2/IL-33 system in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 16 (7): 1097-1107.
- BEN-HUR T. (2008) Immunomodulation by neural stem cells. *J Neurol Sci* 265 (1-2): 102-104.
- BENNETT J. L., BLANCHET, M. R., ZHAO, L., ZBYTNUK, L., ANTIGNANO, F., GOLD, M., KUBES, P. et MCNAGNY, K. M. (2009) Bone marrow-derived mast cells accumulate in the central nervous system during inflammation but are dispensable for

- experimental autoimmune encephalomyelitis pathogenesis. *J Immunol* 182 (9): 5507-5514.
- BEN-NUN A., KAUSHANSKY, N., KAWAKAMI, N., KRISHNAMOORTHY, G., BERER, K., LIBLAU, R., HOHLFELD, R. et WEKERLE, H. (2014) From classic to spontaneous and humanized models of multiple sclerosis: impact on understanding pathogenesis and drug development. *J Autoimmun* 54 33-50.
- BERER K., MUES, M., KOUTROLOS, M., RASBI, Z. A., BOZIKI, M., JOHNER, C., WEKERLE, H. et KRISHNAMOORTHY, G. (2011) Commensal microbiota and myelin autoantigen cooperate to trigger autoimmune demyelination. *Nature* 479 (7374): 538-541.
- BERER K., GERDES, L. A., CEKANAVICIUTE, E., JIA, X., XIAO, L., XIA, Z., LIU, C., KLOTZ, L., STAUFFER, U., BARANZINI, S. E., KUMPFEL, T., HOHLFELD, R., KRISHNAMOORTHY, G. et WEKERLE, H. (2017) Gut microbiota from multiple sclerosis patients enables spontaneous autoimmune encephalomyelitis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114 (40): 10719-10724.
- BERGERS G., REIKERSTORFER, A., BRASELMANN, S., GRANINGER, P. et BUSSLINGER, M. (1994) Alternative promoter usage of the Fos-responsive gene Fit-1 generates mRNA isoforms coding for either secreted or membrane-bound proteins related to the IL-1 receptor. *Embo J* 13 (5): 1176-1188.
- BERTELSEN G. A., REBELLO, S. et GULATI, A. (1992) Characteristics of endothelin receptors in the cerebral cortex and spinal cord of aged rats. *Neurobiol Aging* 13 (4): 513-519.
- BEZZI P., GUNDERSEN, V., GALBETE, J. L., SEIFERT, G., STEINHAUSER, C., PILATI, E. et VOLTERRA, A. (2004) Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate. *Nat Neurosci* 7 (6): 613-620.
- BIALAS A. R. et STEVENS, B. (2013) TGF-beta signaling regulates neuronal C1q expression and developmental synaptic refinement. *Nat Neurosci* 16 (12): 1773-1782.
- BINAME F., SAKRY, D., DIMOU, L., JOLIVEL, V. et TROTTER, J. (2013) NG2 regulates directional migration of oligodendrocyte precursor cells via Rho GTPases and polarity complex proteins. *J Neurosci* 33 (26): 10858-10874.
- BLACK R. A., RAUCH, C. T., KOZLOSKY, C. J., PESCHON, J. J., SLACK, J. L., WOLFSON, M. F., CASTNER, B. J., STOCKING, K. L., REDDY, P., SRINIVASAN, S., NELSON, N., BOIANI, N., SCHOOLEY, K. A., GERHART, M., DAVIS, R., FITZNER, J. N., JOHNSON, R. S., PAXTON, R. J., MARCH, C. J. et CERRETTI, D. P. (1997) A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* 385 (6618): 729-733.



- BODDUM K., JENSEN, T. P., MAGLOIRE, V., KRISTIANSEN, U., RUSAKOV, D. A., PAVLOV, I. et WALKER, M. C. (2016) Astrocytic GABA transporter activity modulates excitatory neurotransmission. *Nat Commun* 7 13572.
- BOISVERT M. M., ERIKSON, G. A., SHOKHIREV, M. N. et ALLEN, N. J. (2018) The Aging Astrocyte Transcriptome from Multiple Regions of the Mouse Brain. *Cell Rep* 22 (1): 269-285.
- BOOTH P. L. et THOMAS, W. E. (1991) Evidence for motility and pinocytosis in ramified microglia in tissue culture. *Brain Res* 548 (1-2): 163-171.
- BOTCHKINA G. I., MEISTRELL, M. E., 3RD, BOTCHKINA, I. L. et TRACEY, K. J. (1997) Expression of TNF and TNF receptors (p55 and p75) in the rat brain after focal cerebral ischemia. *Mol Med* 3 (11): 765-781.
- BOUZIER-SORE A. K. et PELLERIN, L. (2013) Unraveling the complex metabolic nature of astrocytes. *Front Cell Neurosci* 7 179.
- BOWSER D. N. et KHAKH, B. S. (2007) Two forms of single-vesicle astrocyte exocytosis imaged with total internal reflection fluorescence microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (10): 4212-4217.
- BRADDING P. et ARTHUR, G. (2016) Mast cells in asthma--state of the art. *Clin Exp Allergy* 46 (2): 194-263.
- BRAY G. M., STRACHAN, D., TOMLINSON, M., BIENEK, A. et PELLETIER, C. (2014) Établir les connexions : mieux comprendre les affections neurologiques au Canada. Ottawa (Agence de la santé publique du Canada), paru en septembre 2014, 118.
- BRIBIAN A., BARALLOBRE, M. J., SOUSSI-YANICOSTAS, N. et DE CASTRO, F. (2006) Anosmin-1 modulates the FGF-2-dependent migration of oligodendrocyte precursors in the developing optic nerve. *Mol Cell Neurosci* 33 (1): 2-14.
- BRIBIAN A., ESTEBAN, P. F., CLEMENTE, D., SOUSSI-YANICOSTAS, N., THOMAS, J. L., ZALC, B. et DE CASTRO, F. (2008) A novel role for anosmin-1 in the adhesion and migration of oligodendrocyte precursors. *Dev Neurobiol* 68 (13): 1503-1516.
- BRINT E. K., FITZGERALD, K. A., SMITH, P., COYLE, A. J., GUTIERREZ-RAMOS, J. C., FALLON, P. G. et O'NEILL, L. A. (2002) Characterization of signaling pathways activated by the interleukin 1 (IL-1) receptor homologue T1/ST2. A role for Jun N-terminal kinase in IL-4 induction. *J Biol Chem* 277 (51): 49205-49211.
- BROCH K., UELAND, T., NYMO, S. H., KJEKSHUS, J., HULTHE, J., MUNTENDAM, P., MCMURRAY, J. J., WIKSTRAND, J., CLELAND, J. G., AUKRUST, P. et GULLESTAD, L. (2012) Soluble ST2 is associated with adverse outcome in patients with heart failure of ischaemic aetiology. *Eur J Heart Fail* 14 (3): 268-277.

- BROCKHAUS J., MOLLER, T. et KETTENMANN, H. (1996) Phagocytosing ameboid microglial cells studied in a mouse corpus callosum slice preparation. *Glia* 16 (1): 81-90.
- BRODAL P. (2010) Chapter 28 : Visceral Efferent Neurons: The Sympathetic and Parasympathetic Divisions. Dans Oxford University Press (Éds). *The central nervous system : structure and function*. New York; Toronto (4th edition), 413-431.
- BROWN A. M., BALTAN TEKKOK, S. et RANSOM, B. R. (2004) Energy transfer from astrocytes to axons: the role of CNS glycogen. *Neurochem Int* 45 (4): 529-536.
- BROWN J. H., BRANDL, K. et WESS, J. (2017) Chapter 9: Muscarinic Receptor Agonists and Antagonists. Dans McGraw-Hill Education LLC. (Éds). *Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics*. New York (13th edition), 149-162.
- BRUNNER M., KRENN, C., ROTH, G., MOSER, B., DWORSCHAK, M., JENSEN-JAROLIM, E., SPITTLER, A., SAUTNER, T., BONAROS, N., WOLNER, E., BOLTZ-NITULESCU, G. et ANKERSMIT, H. J. (2004) Increased levels of soluble ST2 protein and IgG1 production in patients with sepsis and trauma. *Intensive Care Med* 30 (7): 1468-1473.
- BUC M. (2013) Role of regulatory T cells in pathogenesis and biological therapy of multiple sclerosis. *Mediators Inflamm* 2013 963748.
- BYERS D. E., ALEXANDER-BRETT, J., PATEL, A. C., AGAPOV, E., DANG-VU, G., JIN, X., WU, K., YOU, Y., ALEVY, Y., GIRARD, J. P., STAPPENBECK, T. S., PATTERSON, G. A., PIERCE, R. A., BRODY, S. L. et HOLTZMAN, M. J. (2012) Long-term IL-33-producing epithelial progenitor cells in chronic obstructive lung disease. *J Clin Invest* 123 (9): 3967-3982.
- CACABELOS R., TORRELLAS, C., FERNANDEZ-NOVOA, L. et LOPEZ-MUNOZ, F. (2016) Histamine and Immune Biomarkers in CNS Disorders. *Mediators Inflamm* 2016 1924603.
- CALVER A. R., HALL, A. C., YU, W. P., WALSH, F. S., HEATH, J. K., BETSHOLTZ, C. et RICHARDSON, W. D. (1998) Oligodendrocyte population dynamics and the role of PDGF in vivo. *Neuron* 20 (5): 869-882.
- CAPLAN A. I. (2009) Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *J Pathol* 217 (2): 318-324.
- CARLOCK C., WU, J., SHIM, J., MORENO-GONZALEZ, I., PITCHER, M. R., HICKS, J., SUZUKI, A., IWATA, J., QUEVEDO, J. et LOU, Y. (2017) Interleukin33 deficiency causes tau abnormality and neurodegeneration with Alzheimer-like symptoms in aged mice. *Transl Psychiatry* 7 (7): e1164.
- CARRIERE V., ROUSSEL, L., ORTEGA, N., LACORRE, D. A., AMERICH, L., AGUILAR, L., BOUCHE, G. et GIRARD, J. P. (2007) IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2

- receptor, is a chromatin-associated nuclear factor in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (1): 282-287.
- CARTER P. et WELLS, J. A. (1988) Dissecting the catalytic triad of a serine protease. *Nature* 332 (6164): 564-568.
- CASACCIA-BONNEFIL P., HARDY, R. J., TENG, K. K., LEVINE, J. M., KOFF, A. et CHAO, M. V. (1999) Loss of p27Kip1 function results in increased proliferative capacity of oligodendrocyte progenitors but unaltered timing of differentiation. *Development* 126 (18): 4027-4037.
- CAUGHEY G. H. (2011) Mast cell proteases as protective and inflammatory mediators. *Adv Exp Med Biol* 716 212-234.
- CAYROL C. et GIRARD, J. P. (2009) The IL-1-like cytokine IL-33 is inactivated after maturation by caspase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (22): 9021-9026.
- CEKANAVICIUTE E., YOO, B. B., RUNIA, T. F., DEBELIUS, J. W., SINGH, S., NELSON, C. A., KANNER, R., BENCOSME, Y., LEE, Y. K., HAUSER, S. L., CRABTREE-HARTMAN, E., SAND, I. K., GACIAS, M., ZHU, Y., CASACCIA, P., CREE, B. A. C., KNIGHT, R., MAZMANIAN, S. K. et BARANZINI, S. E. (2017) Gut bacteria from multiple sclerosis patients modulate human T cells and exacerbate symptoms in mouse models. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114 (40): 10713-10718.
- CHACKERIAN A. A., OLDHAM, E. R., MURPHY, E. E., SCHMITZ, J., PFLANZ, S. et KASTELEIN, R. A. (2007) IL-1 receptor accessory protein and ST2 comprise the IL-33 receptor complex. *J Immunol* 179 (4): 2551-2555.
- CHANG K. J., ZOLLINGER, D. R., SUSUKI, K., SHERMAN, D. L., MAKARA, M. A., BROPHY, P. J., COOPER, E. C., BENNETT, V., MOHLER, P. J. et RASBAND, M. N. (2014) Glial ankyrins facilitate paranodal axoglial junction assembly. *Nat Neurosci* 17 (12): 1673-1681.
- CHARLES P., HERNANDEZ, M. P., STANKOFF, B., AIGROT, M. S., COLIN, C., ROUGON, G., ZALC, B. et LUBETZKI, C. (2000) Negative regulation of central nervous system myelination by polysialylated-neural cell adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (13): 7585-7590.
- CHECCHIN D., SENNLAUB, F., LEVAVASSEUR, E., LEDUC, M. et CHEMTOB, S. (2006) Potential role of microglia in retinal blood vessel formation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47 (8): 3595-3602.
- CHEN C. C., GRIMBALDESTON, M. A., TSAI, M., WEISSMAN, I. L. et GALLI, S. J. (2005) Identification of mast cell progenitors in adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (32): 11408-11413.

- CHEN H., SUN, Y., LAI, L., WU, H., XIAO, Y., MING, B., GAO, M., ZOU, H., XIONG, P., XU, Y., TAN, Z., GONG, F. et ZHENG, F. (2015) Interleukin-33 is released in spinal cord and suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *Neuroscience* 308 157-168.
- CHENG Y., SUN, L., XIE, Z., FAN, X., CAO, Q., HAN, J., ZHU, J. et JIN, T. (2017) Diversity of immune cell types in multiple sclerosis and its animal model: Pathological and therapeutic implications. *J Neurosci Res* 95 (10): 1973-1983.
- CHERRY W. B., YOON, J., BARTEMES, K. R., IJIMA, K. et KITA, H. (2008) A novel IL-1 family cytokine, IL-33, potently activates human eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 121 (6): 1484-1490.
- CHEW L. J., SHEN, W., MING, X., SENATOROV, V. V., JR., CHEN, H. L., CHENG, Y., HONG, E., KNOBLACH, S. et GALLO, V. (2011) SRY-box containing gene 17 regulates the Wnt/beta-catenin signaling pathway in oligodendrocyte progenitor cells. *J Neurosci* 31 (39): 13921-13935.
- CHRISTOPHI G. P., GRUBER, R. C., PANOS, M., CHRISTOPHI, R. L., JUBELT, B. et MASSA, P. T. (2012) Interleukin-33 upregulation in peripheral leukocytes and CNS of multiple sclerosis patients. *Clin Immunol* 142 (3): 308-319.
- CHRISTY A. L., WALKER, M. E., HESSNER, M. J. et BROWN, M. A. (2013) Mast cell activation and neutrophil recruitment promotes early and robust inflammation in the meninges in EAE. *J Autoimmun* 42 50-61.
- CHUNG I. Y. et BENVENISTE, E. N. (1990) Tumor necrosis factor-alpha production by astrocytes. Induction by lipopolysaccharide, IFN-gamma, and IL-1 beta. *J Immunol* 144 (8): 2999-3007.
- CHUNG W. S., CLARKE, L. E., WANG, G. X., STAFFORD, B. K., SHER, A., CHAKRABORTY, C., JOUNG, J., FOO, L. C., THOMPSON, A., CHEN, C., SMITH, S. J. et BARRES, B. A. (2013) Astrocytes mediate synapse elimination through MEGF10 and MERTK pathways. *Nature* 504 (7480): 394-400.
- CIRIELLO J. (1983) Brainstem projections of aortic baroreceptor afferent fibers in the rat. *Neurosci Lett* 36 (1): 37-42.
- COLLINGTON S. J., WILLIAMS, T. J. et WELLER, C. L. (2011) Mechanisms underlying the localisation of mast cells in tissues. *Trends Immunol* 32 (10): 478-485.
- COLMAN D. R., KREIBICH, G., FREY, A. B. et SABATINI, D. D. (1982) Synthesis and incorporation of myelin polypeptides into CNS myelin. *J Cell Biol* 95 (2 Pt 1): 598-608.

- CORREALE J. et FAREZ, M. F. (2015) The Role of Astrocytes in Multiple Sclerosis Progression. *Front Neurol* 6 180.
- COSTANZA M., COLOMBO, M. P. et PEDOTTI, R. (2012) Mast cells in the pathogenesis of multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Int J Mol Sci* 13 (11): 15107-15125.
- COUTURIER N., ZAPPULLA, J. P., LAUWERS-CANCES, V., URO-COSTE, E., DELISLE, M. B., CLANET, M., MONTAGNE, L., VANDER VALK, P., BO, L. et LIBLAU, R. S. (2008) Mast cell transcripts are increased within and outside multiple sclerosis lesions. *J Neuroimmunol* 195 (1-2): 176-185.
- COYLE A. J., LLOYD, C., TIAN, J., NGUYEN, T., ERIKSSON, C., WANG, L., OTTOSON, P., PERSSON, P., DELANEY, T., LEHAR, S., LIN, S., POISSON, L., MEISEL, C., KAMRADT, T., BJERKE, T., LEVINSON, D. et GUTIERREZ-RAMOS, J. C. (1999) Crucial role of the interleukin 1 receptor family member T1/ST2 in T helper cell type 2-mediated lung mucosal immune responses. *J Exp Med* 190 (7): 895-902.
- CRIDLAND R. A., YASHPAL, K., ROMITA, V. V., GAUTHIER, S. et HENRY, J. L. (1987) Distribution of label after intrathecal administration of 125I-substance P in the rat. *Peptides* 8 (2): 213-221.
- DA SILVA E. Z., JAMUR, M. C. et OLIVER, C. (2014) Mast cell function: a new vision of an old cell. *J Histochem Cytochem* 62 (10): 698-738.
- D'AMICO M., BERRINO, L., FILIPPELLI, A., MAIONE, S. et ROSSI, F. (1994) Relation between L-arginine-nitric oxide pathway and endothelin-1 effects in periaqueductal gray area of rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 24 (6): 974-978.
- D'AMICO M., BERRINO, L., MAIONE, S., PIZZIRUSSO, A. et ROSSI, F. (1995) Effects of L-name on endothelin-1-induced barrel-rolling in periaqueductal gray area of rats. *Life Sci* 57 (22): PL357-360.
- D'AMICO M., BERRINO, L., MAIONE, S. et ROSSI, F. (1996) Selective and non-selective ET antagonists reveal an ETB receptors mediated ET-1-induced behavioural effect in conscious rats. *Life Sci* 58 (10): PL 177-180.
- DAMPNEY R. A. (1994) The subretrofacial vasomotor nucleus: anatomical, chemical and pharmacological properties and role in cardiovascular regulation. *Prog Neurobiol* 42 (2): 197-227.
- DASHWOOD M. R. et LOESCH, A. (2010) Endothelin-1 as a neuropeptide: neurotransmitter or neurovascular effects? *J Cell Commun Signal* 4 (1): 51-62.

- DE GROVE K. C., PROVOOST, S., BRAUN, H., BLOMME, E. E., TEUFELBERGER, A. R., KRYSKO, O., BEYAERT, R., BRUSSELLE, G. G., JOOS, G. F. et MAES, T. (2018) IL-33 signaling contributes to pollutant-induced allergic airway inflammation. *Clin Exp Allergy*
- DE LA FUENTE M., MACDONALD, T. T. et HERMOSO, M. A. (2015) The IL-33/ST2 axis: Role in health and disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 26 (6): 615-623.
- DE VRIES H. E., BLOM-ROOSEMALEN, M. C., VAN OOSTEN, M., DE BOER, A. G., VAN BERKEL, T. J., BREIMER, D. D. et KUIPER, J. (1996) The influence of cytokines on the integrity of the blood-brain barrier in vitro. *J Neuroimmunol* 64 (1): 37-43.
- DECKER L., AVELLANA-ADALID, V., NAIT-OUESMAR, B., DURBEC, P. et BARON-VAN EVERCOOREN, A. (2000) Oligodendrocyte precursor migration and differentiation: combined effects of PSA residues, growth factors, and substrates. *Mol Cell Neurosci* 16 (4): 422-439.
- D'HAESELEER M., CAMBRON, M., VANOPDENBOSCH, L. et DE KEYSER, J. (2011) Vascular aspects of multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 10 (7): 657-666.
- D'HAESELEER M., BEELEN, R., FIERENS, Y., CAMBRON, M., VANBINST, A. M., VERBORGH, C., DEMEY, J. et DE KEYSER, J. (2013) Cerebral hypoperfusion in multiple sclerosis is reversible and mediated by endothelin-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110 (14): 5654-5658.
- DIETSCH G. N. et HINRICHS, D. J. (1991) Mast cell proteases liberate stable encephalitogenic fragments from intact myelin. *Cell Immunol* 135 (2): 541-548.
- DIMOU L. et GALLO, V. (2015) NG2-glia and their functions in the central nervous system. *Glia* 63 (8): 1429-1451.
- DINARELLO C. A. (1988) Biology of interleukin 1. *Faseb J* 2 (2): 108-115.
- DINES K. C. et POWELL, H. C. (1997) Mast cell interactions with the nervous system: relationship to mechanisms of disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 56 (6): 627-640.
- DINIZ L. P., ALMEIDA, J. C., TORTELLI, V., VARGAS LOPES, C., SETTI-PERDIGAO, P., STIPURSKY, J., KAHN, S. A., ROMAO, L. F., DE MIRANDA, J., ALVES-LEON, S. V., DE SOUZA, J. M., CASTRO, N. G., PANIZZUTTI, R. et GOMES, F. C. (2012) Astrocyte-induced synaptogenesis is mediated by transforming growth factor beta signaling through modulation of D-serine levels in cerebral cortex neurons. *J Biol Chem* 287 (49): 41432-41445.
- DONG H., ZHANG, W., ZENG, X., HU, G., ZHANG, H., HE, S. et ZHANG, S. (2014a) Histamine induces upregulated expression of histamine receptors and increases release of inflammatory mediators from microglia. *Mol Neurobiol* 49 (3): 1487-1500.

- DONG H., ZHANG, X. et QIAN, Y. (2014b) Mast cells and neuroinflammation. *Med Sci Monit Basic Res* 20 200-206.
- D'ORLEANS-JUSTE P., PLANTE, M., HONORE, J. C., CARRIER, E. et LABONTE, J. (2003) Synthesis and degradation of endothelin-1. *Can J Physiol Pharmacol* 81 (6): 503-510.
- D'ORLEANS-JUSTE P., HOUDE, M., RAE, G. A., BKAILY, G., CARRIER, E. et SIMARD, E. (2008) Endothelin-1 (1-31): from chymase-dependent synthesis to cardiovascular pathologies. *Vascul Pharmacol* 49 (2-3): 51-62.
- DUFFY S. S., LEES, J. G. et MOALEM-TAYLOR, G. (2014) The contribution of immune and glial cell types in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Mult Scler Int* 2014 285245.
- DUNNE A. et O'NEILL, L. A. (2003) The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense. *Sci STKE* 2003 (171): re3.
- DZIEMBOWSKA M., THAM, T. N., LAU, P., VITRY, S., LAZARINI, F. et DUBOIS-DALCQ, M. (2005) A role for CXCR4 signaling in survival and migration of neural and oligodendrocyte precursors. *Glia* 50 (3): 258-269.
- ELIEH-ALI-KOMI D. et CAO, Y. (2017) Role of Mast Cells in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis and Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Clin Rev Allergy Immunol* 52 (3): 436-445.
- ELKABES S., DiCICCO-BLOOM, E. M. et BLACK, I. B. (1996) Brain microglia/macrophages express neurotrophins that selectively regulate microglial proliferation and function. *J Neurosci* 16 (8): 2508-2521.
- EMERY B., AGALLIU, D., CAHOY, J. D., WATKINS, T. A., DUGAS, J. C., MULINYAWE, S. B., IBRAHIM, A., LIGON, K. L., ROWITCH, D. H. et BARRES, B. A. (2009) Myelin gene regulatory factor is a critical transcriptional regulator required for CNS myelination. *Cell* 138 (1): 172-185.
- EMOTO N. et YANAGISAWA, M. (1995) Endothelin-converting enzyme-2 is a membrane-bound, phosphoramidon-sensitive metalloprotease with acidic pH optimum. *J Biol Chem* 270 (25): 15262-15268.
- ENERBACK L., KOLSET, S. O., KUSCHE, M., HJERPE, A. et LINDAHL, U. (1985) Glycosaminoglycans in rat mucosal mast cells. *Biochem J* 227 (2): 661-668.
- ENG L. F. (1985) Glial fibrillary acidic protein (GFAP): the major protein of glial intermediate filaments in differentiated astrocytes. *J Neuroimmunol* 8 (4-6): 203-214.

- ENG L. F., GHIRNIKAR, R. S. et LEE, Y. L. (2000) Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res* 25 (9-10): 1439-1451.
- ERNSBERGER U. (2001) The development of postganglionic sympathetic neurons: coordinating neuronal differentiation and diversification. *Auton Neurosci* 94 (1-2): 1-13.
- ERNY D., HRABE DE ANGELIS, A. L., JAITIN, D., WIEGHOFER, P., STASZEWSKI, O., DAVID, E., KEREN-SHAUL, H., MAHLAKOIV, T., JAKOBSHAGEN, K., BUCH, T., SCHWIERZECK, V., UTERMÖHLEN, O., CHUN, E., GARRETT, W. S., MCCOY, K. D., DIEFENBACH, A., STAEHEL, P., STECHER, B., AMIT, I. et PRINZ, M. (2015) Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS. *Nat Neurosci* 18 (7): 965-977.
- FAIRBANKS C. A. (2003) Spinal delivery of analgesics in experimental models of pain and analgesia. *Adv Drug Deliv Rev* 55 (8): 1007-1041.
- FAN J., UNOKI, H., IWASA, S. et WATANABE, T. (2000) Role of endothelin-1 in atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 902 84-93; discussion 93-84.
- FARHY-TSELNICKER I., VAN CASTEREN, A. C. M., LEE, A., CHANG, V. T., ARICESCU, A. R. et ALLEN, N. J. (2017) Astrocyte-Secreted Glypican 4 Regulates Release of Neuronal Pentraxin 1 from Axons to Induce Functional Synapse Formation. *Neuron* 96 (2): 428-445 e413.
- FERGUSON A. V. et SMITH, P. (1990) Cardiovascular responses induced by endothelin microinjection into area postrema. *Regul Pept* 27 (1): 75-85.
- FERNANDO V., OMURA, S., SATO, F., KAWAI, E., MARTINEZ, N. E., ELLIOTT, S. F., YOH, K., TAKAHASHI, S. et TSUNODA, I. (2014) Regulation of an autoimmune model for multiple sclerosis in Th2-biased GATA3 transgenic mice. *Int J Mol Sci* 15 (2): 1700-1718.
- FEYERABEND T. B., HAUSSER, H., TIETZ, A., BLUM, C., HELLMAN, L., STRAUS, A. H., TAKAHASHI, H. K., MORGAN, E. S., DVORAK, A. M., FEHLING, H. J. et RODEWALD, H. R. (2005) Loss of histochemical identity in mast cells lacking carboxypeptidase A. *Mol Cell Biol* 25 (14): 6199-6210.
- FEYERABEND T. B., WEISER, A., TIETZ, A., STASSEN, M., HARRIS, N., KOPE, M., RADERMACHER, P., MÖLLER, P., BENOIST, C., MATHIS, D., FEHLING, H. J. et RODEWALD, H. R. (2011) Cre-mediated cell ablation contests mast cell contribution in models of antibody- and T cell-mediated autoimmunity. *Immunity* 35 (5): 832-844.
- FODINGER M., FRITSCH, G., WINKLER, K., EMMINGER, W., MITTERBAUER, G., GADNER, H., VALENT, P. et MANNHALTER, C. (1994) Origin of human mast cells: development



- from transplanted hematopoietic stem cells after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 84 (9): 2954-2959.
- FORD D. V., JONES, K. H., MIDDLETON, R. M., LOCKHART-JONES, H., MARAMBA, I. D., NOBLE, G. J., OSBORNE, L. A. et LYONS, R. A. (2012) The feasibility of collecting information from people with Multiple Sclerosis for the UK MS Register via a web portal: characterising a cohort of people with MS. *BMC Med Inform Decis Mak* 12 73.
- FRANKLIN R. J. et GOLDMAN, S. A. (2015) Glia Disease and Repair-Remyelination. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7 (7): a020594.
- FREEDMAN R. R., SABHARWAL, S. C. et DESAI, N. (1987) Sex differences in peripheral vascular adrenergic receptors. *Circ Res* 61 (4): 581-585.
- FU A. K., HUNG, K. W., YUEN, M. Y., ZHOU, X., MAK, D. S., CHAN, I. C., CHEUNG, T. H., ZHANG, B., FU, W. Y., LIEW, F. Y. et IP, N. Y. (2016) IL-33 ameliorates Alzheimer's disease-like pathology and cognitive decline. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113 (19): E2705-2713.
- FU W., RUANGKITISAKUL, A., MAC TAVISH, D., BAKER, G. B., BALLANYI, K. et JHAMANDAS, J. H. (2013) Activity and metabolism-related Ca<sup>2+</sup> and mitochondrial dynamics in co-cultured human fetal cortical neurons and astrocytes. *Neuroscience* 250 520-535.
- FUNFSCHILLING U., SUPPLIE, L. M., MAHAD, D., BORETIUS, S., SAAB, A. S., EDGAR, J., BRINKMANN, B. G., KASSMANN, C. M., TZVETANOVA, I. D., MOBIUS, W., DIAZ, F., MEIJER, D., SUTER, U., HAMPRECHT, B., SEREDA, M. W., MORAES, C. T., FRAHM, J., GOEBBELS, S. et NAVE, K. A. (2012) Glycolytic oligodendrocytes maintain myelin and long-term axonal integrity. *Nature* 485 (7399): 517-521.
- FURUNO T., ITO, A., KOMA, Y., WATABE, K., YOKOZAKI, H., BIENENSTOCK, J., NAKANISHI, M. et KITAMURA, Y. (2005) The spermatogenic Ig superfamily/synaptic cell adhesion molecule mast-cell adhesion molecule promotes interaction with nerves. *J Immunol* 174 (11): 6934-6942.
- FUXE K., CINTRA, A., ANDBJER, B., ANGGARD, E., GOLDSTEIN, M. et AGNATI, L. F. (1989) Centrally administered endothelin-1 produces lesions in the brain of the male rat. *Acta Physiol Scand* 137 (1): 155-156.
- GADANI S. P., WALSH, J. T., SMIRNOV, I., ZHENG, J. et KIPNIS, J. (2015) The glia-derived alarmin IL-33 orchestrates the immune response and promotes recovery following CNS injury. *Neuron* 85 (4): 703-709.
- GALLI S. J., NAKAE, S. et TSAI, M. (2005) Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol* 6 (2): 135-142.

- GALLI S. J., BORREGAARD, N. et WYNN, T. A. (2011) Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nat Immunol* 12 (11): 1035-1044.
- GALLWITZ M. et HELLMAN, L. (2006) Rapid lineage-specific diversification of the mast cell chymase locus during mammalian evolution. *Immunogenetics* 58 (8): 641-654.
- GANDHI R., LARONI, A. et WEINER, H. L. (2010) Role of the innate immune system in the pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 221 (1-2): 7-14.
- GARCION E., FAISSNER, A. et FFRENCH-CONSTANT, C. (2001) Knockout mice reveal a contribution of the extracellular matrix molecule tenascin-C to neural precursor proliferation and migration. *Development* 128 (13): 2485-2496.
- GIAID A., GIBSON, S. J., IBRAHIM, B. N., LEGON, S., BLOOM, S. R., YANAGISAWA, M., MASAKI, T., VARNDELL, I. M. et POLAK, J. M. (1989) Endothelin 1, an endothelium-derived peptide, is expressed in neurons of the human spinal cord and dorsal root ganglia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 (19): 7634-7638.
- GIANNESI D., DEL RY, S. et VITALE, R. L. (2001) The role of endothelins and their receptors in heart failure. *Pharmacol Res* 43 (2): 111-126.
- GILFILLAN A. M., PEAVY, R. D. et METCALFE, D. D. (2009) Amplification mechanisms for the enhancement of antigen-mediated mast cell activation. *Immunol Res* 43 (1-3): 15-24.
- GINHOUX F., LIM, S., HOEFFEL, G., LOW, D. et HUBER, T. (2013) Origin and differentiation of microglia. *Front Cell Neurosci* 7 45.
- GIULIANI S., LECCI, A., MAGGI, C. A., ROVERO, P. et GIACHETTI, A. (1991) Effect of intrathecal administration of ET-1, ET-3 and ET(16-21) on blood pressure and micturition reflex in anesthetized rats. *Neurochem Int* 18 (4): 565-569.
- GOLDMAN S. A. et KUYPERS, N. J. (2015) How to make an oligodendrocyte. *Development* 142 (23): 3983-3995.
- GOODIN D. S. (2014) The epidemiology of multiple sclerosis: insights to disease pathogenesis. *Handb Clin Neurol* 122 231-266.
- GOODIN D. S. (2016) The epidemiology of multiple sclerosis: insights to a causal cascade. *Handb Clin Neurol* 138 173-206.
- GRAVEL M., PETERSON, J., YONG, V. W., KOTTIS, V., TRAPP, B. et BRAUN, P. E. (1996) Overexpression of 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in transgenic mice alters oligodendrocyte development and produces aberrant myelination. *Mol Cell Neurosci* 7 (6): 453-466.

- GRAY G. A. et WEBB, D. J. (1996) The endothelin system and its potential as a therapeutic target in cardiovascular disease. *Pharmacol Ther* 72 (2): 109-148.
- GREENBERG G. et BURNSTOCK, G. (1983) A novel cell-to-cell interaction between mast cells and other cell types. *Exp Cell Res* 147 (1): 1-13.
- GREGORY G. D., ROBBIE-RYAN, M., SECOR, V. H., SABATINO, J. J., JR. et BROWN, M. A. (2005) Mast cells are required for optimal autoreactive T cell responses in a murine model of multiple sclerosis. *Eur J Immunol* 35 (12): 3478-3486.
- GRELL M., DOUNI, E., WAJANT, H., LOHDEN, M., CLAUSS, M., MAXEINER, B., GEORGOPOULOS, S., LESSLAUER, W., KOLLIAS, G., PFIZENMAIER, K. et SCHEURICH, P. (1995) The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 83 (5): 793-802.
- GULATI A. (1991) Characteristics of endothelin binding sites in the spinal cord of spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol* 204 (3): 287-293.
- GULATI A., REBELLO, S. et KUMAR, A. (1997) Role of sympathetic nervous system in cardiovascular effects of centrally administered endothelin-1 in rats. *Am J Physiol* 273 (3 Pt 2): H1177-1186.
- GURNIK S., DEVRAJ, K., MACAS, J., YAMAJI, M., STARKE, J., SCHOLZ, A., SOMMER, K., DI TACCHIO, M., VUTUKURI, R., BECK, H., MITTELBRONN, M., FOERCH, C., PFEILSCHIFTER, W., LIEBNER, S., PETERS, K. G., PLATE, K. H. et REISS, Y. (2016) Angiopoietin-2-induced blood-brain barrier compromise and increased stroke size are rescued by VE-PTP-dependent restoration of Tie2 signaling. *Acta Neuropathol* 131 (5): 753-773.
- GUSEL'NIKOVA V. V. et KORZHEVSKIY, D. E. (2015) NeuN As a Neuronal Nuclear Antigen and Neuron Differentiation Marker. *Acta Naturae* 7 (2): 42-47.
- GUTIERREZ E. G., BANKS, W. A. et KASTIN, A. J. (1993) Murine tumor necrosis factor alpha is transported from blood to brain in the mouse. *J Neuroimmunol* 47 (2): 169-176.
- HALLGREN J. et GURISH, M. F. (2007) Pathways of murine mast cell development and trafficking: tracking the roots and routes of the mast cell. *Immunol Rev* 217 8-18.
- HAMANOE M., TAKEMOTO, N., MATSUMOTO, K., NAKAMURA, T., NAKAJIMA, K. et KOHSAKA, S. (1996) Neurotrophic effect of hepatocyte growth factor on central nervous system neurons in vitro. *J Neurosci Res* 43 (5): 554-564.
- HAMMOND T. R., MCELLIN, B., MORTON, P. D., RAYMOND, M., DUPREE, J. et GALLO, V. (2015) Endothelin-B Receptor Activation in Astrocytes Regulates the Rate of Oligodendrocyte Regeneration during Remyelination. *Cell Rep* 13 (10): 2090-2097.

- HAN S. P., CHEN, X. L., WESTFALL, T. C. et KNUEPFER, M. M. (1991) Characterization of the depressor effect of intrathecal endothelin in anesthetized rats. *Am J Physiol* 260 (5 Pt 2): H1685-1691.
- HARAUZ G., LADIZHANSKY, V. et BOGGS, J. M. (2009) Structural polymorphism and multifunctionality of myelin basic protein. *Biochemistry* 48 (34): 8094-8104.
- HARDMAN C. S., PANOVA, V. et MCKENZIE, A. N. (2013) IL-33 citrine reporter mice reveal the temporal and spatial expression of IL-33 during allergic lung inflammation. *Eur J Immunol* 43 (2): 488-498.
- HASHIM M. A. et TADEPALLI, A. S. (1991) Functional evidence for the presence of a phosphoramidon-sensitive enzyme in rat brain that converts big endothelin-1 to endothelin-1. *Life Sci* 49 (24): PL207-211.
- HASHIM M. A. et TADEPALLI, A. S. (1992) Hemodynamic responses evoked by endothelin from central cardiovascular neural substrates. *Am J Physiol* 262 (1 Pt 2): H1-9.
- HAYAKAWA H., HAYAKAWA, M., KUME, A. et TOMINAGA, S. (2007) Soluble ST2 blocks interleukin-33 signaling in allergic airway inflammation. *J Biol Chem* 282 (36): 26369-26380.
- HEDSTROM L. (2002) Serine protease mechanism and specificity. *Chem Rev* 102 (12): 4501-4524.
- HENDRIKS J. J., TEUNISSEN, C. E., DE VRIES, H. E. et DIJKSTRA, C. D. (2005) Macrophages and neurodegeneration. *Brain Res Brain Res Rev* 48 (2): 185-195.
- HENDRIKSEN E., VAN BERGEIJK, D., OOSTING, R. S. et REDEGELD, F. A. (2017) Mast cells in neuroinflammation and brain disorders. *Neurosci Biobehav Rev* 79 119-133.
- HENNEBERGER C., PAPOUIN, T., OLIET, S. H. et RUSAKOV, D. A. (2010) Long-term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes. *Nature* 463 (7278): 232-236.
- HERNAN M. A., OLEK, M. J. et ASCHERIO, A. (2001) Cigarette smoking and incidence of multiple sclerosis. *Am J Epidemiol* 154 (1): 69-74.
- HERTZ L. et PENG, L. (1992) Energy metabolism at the cellular level of the CNS. *Can J Physiol Pharmacol* 70 Suppl S145-157.
- HIBBS R. E. et ZAMBON, A. C. (2017) Chapter 11: Nicotine and Agents Acting at the Neuromuscular Junction and Autonomic Ganglia. Dans McGraw-Hill Education LLC. (Éds). Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics. New York (13th edition), 177-190.

- HOCKING G. et WILDSMITH, J. A. (2004) Intrathecal drug spread. *Br J Anaesth* 93 (4): 568-578.
- HOOGERWERF J. J., TANCK, M. W., VAN ZOELEN, M. A., WITTEBOLE, X., LATERRE, P. F. et VAN DER POLL, T. (2010) Soluble ST2 plasma concentrations predict mortality in severe sepsis. *Intensive Care Med* 36 (4): 630-637.
- HOSODA K., NAKAO, K., HIROSHI, A., SUGA, S., OGAWA, Y., MUKOYAMA, M., SHIRAKAMI, G., SAITO, Y., NAKANISHI, S. et IMURA, H. (1991) Cloning and expression of human endothelin-1 receptor cDNA. *FEBS Lett* 287 (1-2): 23-26.
- HOSOYA Y. et MATSUSHITA, M. (1981) A direct projection from the hypothalamus to the area postrema in the rat, as demonstrated by the HRP and autoradiographic methods. *Brain Res* 214 (1): 144-149.
- HOUDE M., JAMAIN, M. D., LABONTE, J., DESBIENS, L., PEJLER, G., GURISH, M., TAKAI, S. et D'ORLEANS-JUSTE, P. (2013) Pivotal role of mouse mast cell protease 4 in the conversion and pressor properties of Big-endothelin-1. *J Pharmacol Exp Ther* 346 (1): 31-37.
- HOUSLEY W. J., PITT, D. et HAFLER, D. A. (2015) Biomarkers in multiple sclerosis. *Clin Immunol* 161 (1): 51-58.
- HUANG M., ALLEN, D. R., KELLER, D. M., FADEL, P. J., FROHMAN, E. M. et DAVIS, S. L. (2016) Impaired carotid baroreflex control of arterial blood pressure in multiple sclerosis. *J Neurophysiol* 116 (1): 81-87.
- HUANG Y. H., SINHA, S. R., TANAKA, K., ROTHSTEIN, J. D. et BERGLES, D. E. (2004) Astrocyte glutamate transporters regulate metabotropic glutamate receptor-mediated excitation of hippocampal interneurons. *J Neurosci* 24 (19): 4551-4559.
- HUGHES E. G., KANG, S. H., FUKAYA, M. et BERGLES, D. E. (2013) Oligodendrocyte progenitors balance growth with self-repulsion to achieve homeostasis in the adult brain. *Nat Neurosci* 16 (6): 668-676.
- HYLDEN J. L. et WILCOX, G. L. (1980) Intrathecal morphine in mice: a new technique. *Eur J Pharmacol* 67 (2-3): 313-316.
- IBRAHIM M. Z., REDER, A. T., LAWAND, R., TAKASH, W. et SALLOUH-KHATIB, S. (1996) The mast cells of the multiple sclerosis brain. *J Neuroimmunol* 70 (2): 131-138.
- IGARASHI Y., UTSUMI, H., CHIBA, H., YAMADA-SASAMORI, Y., TOBIOKA, H., KAMIMURA, Y., FURUUCHI, K., KOKAI, Y., NAKAGAWA, T., MORI, M. et SAWADA, N. (1999) Glial cell line-derived neurotrophic factor induces barrier function of endothelial cells forming the blood-brain barrier. *Biochem Biophys Res Commun* 261 (1): 108-112.

- IIDA T., YOSHIKAWA, T., MATSUZAWA, T., NAGANUMA, F., NAKAMURA, T., MIURA, Y., MOHSEN, A. S., HARADA, R., IWATA, R. et YANAI, K. (2015) Histamine H3 receptor in primary mouse microglia inhibits chemotaxis, phagocytosis, and cytokine secretion. *Glia* 63 (7): 1213-1225.
- INOUE A., YANAGISAWA, M., KIMURA, S., KASUYA, Y., MIYAUCHI, T., GOTO, K. et MASAKI, T. (1989) The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 (8): 2863-2867.
- IRELAND S. J., MONSON, N. L. et DAVIS, L. S. (2015) Seeking balance: Potentiation and inhibition of multiple sclerosis autoimmune responses by IL-6 and IL-10. *Cytokine* 73 (2): 236-244.
- JACK C., RUFFINI, F., BAR-OR, A. et ANTEL, J. P. (2005) Microglia and multiple sclerosis. *J Neurosci Res* 81 (3): 363-373.
- JAFARZADEH A., MAHDAVI, R., JAMALI, M., HAJGHANI, H., NEMATI, M. et EBRAHIMI, H. A. (2016) Increased Concentrations of Interleukin-33 in the Serum and Cerebrospinal Fluid of Patients with Multiple Sclerosis. *Oman Med J* 31 (1): 40-45.
- JAMUR M. C., GRODZKI, A. C., BERENSTEIN, E. H., HAMAWY, M. M., SIRAGANIAN, R. P. et OLIVER, C. (2005) Identification and characterization of undifferentiated mast cells in mouse bone marrow. *Blood* 105 (11): 4282-4289.
- JAMUR M. C. et OLIVER, C. (2011) Origin, maturation and recruitment of mast cell precursors. *Front Biosci (Schol Ed)* 3 1390-1406.
- JANSSEN B. J., DE CELLE, T., DEBETS, J. J., BROUNS, A. E., CALLAHAN, M. F. et SMITH, T. L. (2004) Effects of anesthetics on systemic hemodynamics in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287 (4): H1618-1624.
- JIANG H. R., MILOVANOVIC, M., ALLAN, D., NIEDBALA, W., BESNARD, A. G., FUKADA, S. Y., ALVES-FILHO, J. C., TOGBE, D., GOODYEAR, C. S., LININGTON, C., XU, D., LUKIC, M. L. et LIEW, F. Y. (2012) IL-33 attenuates EAE by suppressing IL-17 and IFN-gamma production and inducing alternatively activated macrophages. *Eur J Immunol* 42 (7): 1804-1814.
- JIANG Z., JIANG, J. X. et ZHANG, G. X. (2014) Macrophages: a double-edged sword in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunol Lett* 160 (1): 17-22.
- JOHNSON D., SEELDRAEYERS, P. A. et WEINER, H. L. (1988) The role of mast cells in demyelination. 1. Myelin proteins are degraded by mast cell proteases and myelin basic protein and P2 can stimulate mast cell degranulation. *Brain Res* 444 (1): 195-198.

- JONES C. R., HILEY, C. R., PELTON, J. T. et MOHR, M. (1989) Autoradiographic visualization of the binding sites for [125I]endothelin in rat and human brain. *Neurosci Lett* 97 (3): 276-279.
- JONES K. H., FORD, D. V., JONES, P. A., JOHN, A., MIDDLETON, R. M., LOCKHART-JONES, H., OSBORNE, L. A. et NOBLE, J. G. (2012) A large-scale study of anxiety and depression in people with Multiple Sclerosis: a survey via the web portal of the UK MS Register. *PLoS One* 7 (7): e41910.
- KADEL K. A., HEISTAD, D. D. et FARACI, F. M. (1990) Effects of endothelin on blood vessels of the brain and choroid plexus. *Brain Res* 518 (1-2): 78-82.
- KALE N., MAGANA, S., AGAOGLU, J. et TANIK, O. (2009) Assessment of autonomic nervous system dysfunction in multiple sclerosis and association with clinical disability. *Neurol Int* 1 (1): e5.
- KALLIOLIAS G. D. et IVASHKIV, L. B. (2016) TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nat Rev Rheumatol* 12 (1): 49-62.
- KALLWEIT U., ARITAKE, K., BASSETTI, C. L., BLUMENTHAL, S., HAYAISHI, O., LINNEBANK, M., BAUMANN, C. R. et URADE, Y. (2013) Elevated CSF histamine levels in multiple sclerosis patients. *Fluids Barriers CNS* 10 19.
- KAMEKURA R., KOJIMA, T., TAKANO, K., GO, M., SAWADA, N. et HIMI, T. (2012) The role of IL-33 and its receptor ST2 in human nasal epithelium with allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy* 42 (2): 218-228.
- KAR S., CHABOT, J. G. et QUIRION, R. (1991) Quantitative autoradiographic localisation of [125I]endothelin-1 binding sites in spinal cord and dorsal root ganglia of the rat. *Neurosci Lett* 133 (1): 117-120.
- KAREMAKER J. M. (2017) An introduction into autonomic nervous function. *Physiol Meas* 38 (5): R89-R118.
- KATZUNG B. G. (2018) Chapter 6: Introduction to Autonomic Pharmacology. Dans McGraw-Hill Education (Éds). *Basic and Clinical Pharmacology*. (14th edition), 89-106.
- KAUR S. J., MCKEOWN, S. R. et RASHID, S. (2016) Mutant SOD1 mediated pathogenesis of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Gene* 577 (2): 109-118.
- KAWANO Y., YOSHIDA, K., YOSHIMI, H., KURAMOCHI, M. et OMAE, T. (1989) The cardiovascular effect of intracerebroventricular endothelin in rats. *J Hypertens Suppl* 7 (6): S22-23.

- KEFFER J., PROBERT, L., CAZLARIS, H., GEORGOPOULOS, S., KASLARIS, E., KIOUSSIS, D. et KOLLIAS, G. (1991) Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *Embo J* 10 (13): 4025-4031.
- KESSARIS N., FOGARTY, M., IANNARELLI, P., GRIST, M., WEGNER, M. et RICHARDSON, W. D. (2006) Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal elimination of an embryonic lineage. *Nat Neurosci* 9 (2): 173-179.
- KHAKH B. S. et MCCARTHY, K. D. (2015) Astrocyte calcium signaling: from observations to functions and the challenges therein. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7 (4): a020404.
- KIERDORF K. et PRINZ, M. (2017) Microglia in steady state. *J Clin Invest* 127 (9): 3201-3209.
- KIGERL K. A., GENSEL, J. C., ANKENY, D. P., ALEXANDER, J. K., DONNELLY, D. J. et POPOVICH, P. G. (2009) Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord. *J Neurosci* 29 (43): 13435-13444.
- KIM D. Y., JEOUNG, D. et RO, J. Y. (2010) Signaling pathways in the activation of mast cells cocultured with astrocytes and colocalization of both cells in experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol* 185 (1): 273-283.
- KIMELBERG H. K. (2007) Supportive or information-processing functions of the mature protoplasmic astrocyte in the mammalian CNS? A critical appraisal. *Neuron Glia Biol* 3 (3): 181-189.
- KINET J. P. (1999) The high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI): from physiology to pathology. *Annu Rev Immunol* 17 931-972.
- KIPP M., VAN DER STAR, B., VOGEL, D. Y., PUENTES, F., VAN DER VALK, P., BAKER, D. et AMOR, S. (2012) Experimental in vivo and in vitro models of multiple sclerosis: EAE and beyond. *Mult Scler Relat Disord* 1 (1): 15-28.
- KIRBY B. B., TAKADA, N., LATIMER, A. J., SHIN, J., CARNEY, T. J., KELSH, R. N. et APPEL, B. (2006) In vivo time-lapse imaging shows dynamic oligodendrocyte progenitor behavior during zebrafish development. *Nat Neurosci* 9 (12): 1506-1511.
- KITAMURA Y., KASUGAI, T., ARIZONO, N. et MATSUDA, H. (1993) Development of mast cells and basophils: processes and regulation mechanisms. *Am J Med Sci* 306 (3): 185-191.
- KITIC M., KARRAM, K., ISRAEL, N., YOGEV, N., LACHER, S. M., TANG, Y., YIGIT, H., BAUER, J., WANKE, F., KNEZOVIC, A., TROTTER, J., KURSCHUS, F. C. et WAISMAN, A. (2017) NG2 plays a role in neuroinflammation but is not expressed by immune cells. *Acta Neuropathol* 134 (2): 325-327.



- KOBAYASHI T., MIYAUCHI, T., IWASA, S., SAKAI, S., FAN, J., NAGATA, M., GOTO, K. et WATANABE, T. (2000) Corresponding distributions of increased endothelin-B receptor expression and increased endothelin-1 expression in the aorta of apolipoprotein E-deficient mice with advanced atherosclerosis. *Pathol Int* 50 (12): 929-936.
- KOCH-HENRIKSEN N. et SORENSEN, P. S. (2010) The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology. *Lancet Neurol* 9 (5): 520-532.
- KOHZUKI M., CHAI, S. Y., PAXINOS, G., KARAVAS, A., CASLEY, D. J., JOHNSTON, C. I. et MENDELSON, F. A. (1991) Localization and characterization of endothelin receptor binding sites in the rat brain visualized by in vitro autoradiography. *Neuroscience* 42 (1): 245-260.
- KONTOYIANNIS D., PASPARAKIS, M., PIZARRO, T. T., COMINELLI, F. et KOLLIAS, G. (1999) Impaired on/off regulation of TNF biosynthesis in mice lacking TNF AU-rich elements: implications for joint and gut-associated immunopathologies. *Immunity* 10 (3): 387-398.
- KORN T., BETTELLI, E., OUKKA, M. et KUCHROO, V. K. (2009) IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* 27 485-517.
- KORZHEVSKII D. E., PETROVA, E. S., KIRIK, O. V. et OTELLIN, V. A. (2009) Assessment of neuron differentiation during embryogenesis in rats using immunocytochemical detection of doublecortin. *Neurosci Behav Physiol* 39 (6): 513-516.
- KOSEKI C., IMAI, M., HIRATA, Y., YANAGISAWA, M. et MASAKI, T. (1989) Autoradiographic localization of [<sup>125</sup>I]-endothelin-1 binding sites in rat brain. *Neurosci Res* 6 (6): 581-585.
- KOSKIE B. (2018) Multiple Sclerosis: Facts, Statistics, and You. <https://www.healthline.com/health/multiple-sclerosis/facts-statistics-infographic>, 28-septembre-2018.
- KRIEGLER M., PEREZ, C., DEFAY, K., ALBERT, I. et LU, S. D. (1988) A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell* 53 (1): 45-53.
- KUBSIK-GIDLEWSKA A. M., KLIMKIEWICZ, P., KLIMKIEWICZ, R., JANCZEWSKA, K. et WOLDANSKA-OKONSKA, M. (2017) Rehabilitation in multiple sclerosis. *Adv Clin Exp Med* 26 (4): 709-715.
- KUCUKDERELI H., ALLEN, N. J., LEE, A. T., FENG, A., OZLU, M. I., CONATSER, L. M., CHAKRABORTY, C., WORKMAN, G., WEAVER, M., SAGE, E. H., BARRES, B. A. et EROGLU, C. (2011) Control of excitatory CNS synaptogenesis by astrocyte-secreted proteins Hevin and SPARC. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 (32): E440-449.

- KUHLE J., BARRO, C., DISANTO, G., MATHIAS, A., SONESON, C., BONNIER, G., YALDIZLI, O., REGENER, A., DERFUSS, T., CANALES, M., SCHLUEP, M., DU PASQUIER, R., KRUEGER, G. et GRANZIERA, C. (2016) Serum neurofilament light chain in early relapsing remitting MS is increased and correlates with CSF levels and with MRI measures of disease severity. *Mult Scler* 22 (12): 1550-1559.
- KUMADA M., TERUI, N. et KUWAKI, T. (1990) Arterial baroreceptor reflex: its central and peripheral neural mechanisms. *Prog Neurobiol* 35 (5): 331-361.
- KUMAR S., TZIMAS, M. N., GRISWOLD, D. E. et YOUNG, P. R. (1997) Expression of ST2, an interleukin-1 receptor homologue, is induced by proinflammatory stimuli. *Biochem Biophys Res Commun* 235 (3): 474-478.
- KURIHARA Y., KURIHARA, H., SUZUKI, H., KODAMA, T., MAEMURA, K., NAGAI, R., ODA, H., KUWAKI, T., CAO, W. H., KAMADA, N. et ET AL. (1994) Elevated blood pressure and craniofacial abnormalities in mice deficient in endothelin-1. *Nature* 368 (6473): 703-710.
- KUROWSKA-STOLARSKA M., STOLARSKI, B., KEWIN, P., MURPHY, G., CORRIGAN, C. J., YING, S., PITMAN, N., MIRCHANDANI, A., RANA, B., VAN ROOIJEN, N., SHEPHERD, M., MCSHARRY, C., MCINNES, I. B., XU, D. et LIEW, F. Y. (2009) IL-33 amplifies the polarization of alternatively activated macrophages that contribute to airway inflammation. *J Immunol* 183 (10): 6469-6477.
- KUWAKI T., CAO, W. H., UNEKAWA, M., TERUI, N. et KUMADA, M. (1991) Endothelin-sensitive areas in the ventral surface of the rat medulla. *J Auton Nerv Syst* 36 (2): 149-158.
- KUWAKI T., CAO, W. H., KURIHARA, Y., KURIHARA, H., LING, G. Y., ONODERA, M., JU, K. H., YAZAKI, Y. et KUMADA, M. (1996) Impaired ventilatory responses to hypoxia and hypercapnia in mutant mice deficient in endothelin-1. *Am J Physiol* 270 (6 Pt 2): R1279-1286.
- KUWAKI T., KURIHARA, H., CAO, W. H., KURIHARA, Y., UNEKAWA, M., YAZAKI, Y. et KUMADA, M. (1997) Physiological role of brain endothelin in the central autonomic control: from neuron to knockout mouse. *Prog Neurobiol* 51 (5): 545-579.
- KUWAKI T., LING, G. Y., ONODERA, M., ISHII, T., NAKAMURA, A., JU, K. H., CAO, W. H., KUMADA, M., KURIHARA, H., KURIHARA, Y., YAZAKI, Y., OHUCHI, T., YANAGISAWA, M. et FUKUDA, Y. (1999) Endothelin in the central control of cardiovascular and respiratory functions. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26 (12): 989-994.
- LALIVE P. H. (2008) Autoantibodies in inflammatory demyelinating diseases of the central nervous system. *Swiss Med Wkly* 138 (47-48): 692-707.

- LALO U., PALYGIN, O., RASOOLI-NEJAD, S., ANDREW, J., HAYDON, P. G. et PANKRATOV, Y. (2014) Exocytosis of ATP from astrocytes modulates phasic and tonic inhibition in the neocortex. *PLoS Biol* 12 (1): e1001747.
- LAROCQUE D., GALARNEAU, A., LIU, H. N., SCOTT, M., ALMAZAN, G. et RICHARD, S. (2005) Protection of p27(Kip1) mRNA by quaking RNA binding proteins promotes oligodendrocyte differentiation. *Nat Neurosci* 8 (1): 27-33.
- LAURSEN L. S., CHAN, C. W. et FFRENCH-CONSTANT, C. (2011) Translation of myelin basic protein mRNA in oligodendrocytes is regulated by integrin activation and hnRNP-K. *J Cell Biol* 192 (5): 797-811.
- LAWSON L. J., PERRY, V. H., DRI, P. et GORDON, S. (1990) Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 39 (1): 151-170.
- LEE M. E., DE LA MONTE, S. M., NG, S. C., BLOCH, K. D. et QUERTERMOUS, T. (1990) Expression of the potent vasoconstrictor endothelin in the human central nervous system. *J Clin Invest* 86 (1): 141-147.
- LEE S., YOON, B. E., BERGLUND, K., OH, S. J., PARK, H., SHIN, H. S., AUGUSTINE, G. J. et LEE, C. J. (2010) Channel-mediated tonic GABA release from glia. *Science* 330 (6005): 790-796.
- LEE S., LEACH, M. K., REDMOND, S. A., CHONG, S. Y., MELLON, S. H., TUCK, S. J., FENG, Z. Q., COREY, J. M. et CHAN, J. R. (2012a) A culture system to study oligodendrocyte myelination processes using engineered nanofibers. *Nat Methods* 9 (9): 917-922.
- LEE Y., MORRISON, B. M., LI, Y., LENGACHER, S., FARAH, M. H., HOFFMAN, P. N., LIU, Y., TSINGALIA, A., JIN, L., ZHANG, P. W., PELLERIN, L., MAGISTRETTI, P. J. et ROTHSTEIN, J. D. (2012b) Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration. *Nature* 487 (7408): 443-448.
- LEFRANCAIS E. et CAYROL, C. (2012) Mechanisms of IL-33 processing and secretion: differences and similarities between IL-1 family members. *Eur Cytokine Netw* 23 (4): 120-127.
- LEFRANCAIS E., ROGA, S., GAUTIER, V., GONZALEZ-DE-PEREDO, A., MONSARRAT, B., GIRARD, J. P. et CAYROL, C. (2012) IL-33 is processed into mature bioactive forms by neutrophil elastase and cathepsin G. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109 (5): 1673-1678.
- LEFRANCAIS E., DUVAL, A., MIREY, E., ROGA, S., ESPINOSA, E., CAYROL, C. et GIRARD, J. P. (2014) Central domain of IL-33 is cleaved by mast cell proteases for potent activation of group-2 innate lymphoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111 (43): 15502-15507.

- LERAY E., MOREAU, T., FROMONT, A. et EDAN, G. (2016) Epidemiology of multiple sclerosis. *Rev Neurol (Paris)* 172 (1): 3-13.
- LEUNG B. P., XU, D., CULSHAW, S., MCINNES, I. B. et LIEW, F. Y. (2004) A novel therapy of murine collagen-induced arthritis with soluble T1/ST2. *J Immunol* 173 (1): 145-150.
- LI H., TAGO, K., IO, K., KUROIWA, K., ARAI, T., IWAHANA, H., TOMINAGA, S. et YANAGISAWA, K. (2000) The cloning and nucleotide sequence of human ST2L cDNA. *Genomics* 67 (3): 284-290.
- LI H., NOURBAKHS, B., SAFAVI, F., LI, K., XU, H., CULLIMORE, M., ZHOU, F., ZHANG, G. et ROSTAMI, A. (2011) Kit (W-sh) mice develop earlier and more severe experimental autoimmune encephalomyelitis due to absence of immune suppression. *J Immunol* 187 (1): 274-282.
- LI M., LI, Y., LIU, X., GAO, X. et WANG, Y. (2012a) IL-33 blockade suppresses the development of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. *J Neuroimmunol* 247 (1-2): 25-31.
- LI Y., DU, X. F., LIU, C. S., WEN, Z. L. et DU, J. L. (2012b) Reciprocal regulation between resting microglial dynamics and neuronal activity in vivo. *Dev Cell* 23 (6): 1189-1202.
- LIDDELOW S. A., GUTTENPLAN, K. A., CLARKE, L. E., BENNETT, F. C., BOHLEN, C. J., SCHIRMER, L., BENNETT, M. L., MUNCH, A. E., CHUNG, W. S., PETERSON, T. C., WILTON, D. K., FROUIN, A., NAPIER, B. A., PANICKER, N., KUMAR, M., BUCKWALTER, M. S., ROWITCH, D. H., DAWSON, V. L., DAWSON, T. M., STEVENS, B. et BARRES, B. A. (2017) Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature* 541 (7638): 481-487.
- LIEBERMAN A. P., PITHA, P. M., SHIN, H. S. et SHIN, M. L. (1989) Production of tumor necrosis factor and other cytokines by astrocytes stimulated with lipopolysaccharide or a neurotropic virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 (16): 6348-6352.
- LIEBNER S., DIJKHUIZEN, R. M., REISS, Y., PLATE, K. H., AGALLIU, D. et CONSTANTIN, G. (2018) Functional morphology of the blood-brain barrier in health and disease. *Acta Neuropathol* 135 (3): 311-336.
- LIEW F. Y., GIRARD, J. P. et TURNQUIST, H. R. (2016) Interleukin-33 in health and disease. *Nat Rev Immunol* 16 (11): 676-689.
- LINGEL A., WEISS, T. M., NIEBUHR, M., PAN, B., APPLETON, B. A., WIESMANN, C., BAZAN, J. F. et FAIRBROTHER, W. J. (2009) Structure of IL-33 and its interaction with the ST2 and IL-1RAcP receptors--insight into heterotrimeric IL-1 signaling complexes. *Structure* 17 (10): 1398-1410.

- LIU T., CLARK, R. K., McDONNELL, P. C., YOUNG, P. R., WHITE, R. F., BARONE, F. C. et FEUERSTEIN, G. Z. (1994) Tumor necrosis factor- $\alpha$  expression in ischemic neurons. *Stroke* 25 (7): 1481-1488.
- LIU X., HAMMEL, M., HE, Y., TAINER, J. A., JENG, U. S., ZHANG, L., WANG, S. et WANG, X. (2013) Structural insights into the interaction of IL-33 with its receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110 (37): 14918-14923.
- LOHNING M., STROEHMANN, A., COYLE, A. J., GROGAN, J. L., LIN, S., GUTIERREZ-RAMOS, J. C., LEVINSON, D., RADBRUCH, A. et KAMRADT, T. (1998) T1/ST2 is preferentially expressed on murine Th2 cells, independent of interleukin 4, interleukin 5, and interleukin 10, and important for Th2 effector function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (12): 6930-6935.
- LOTT J. M., SUMPTER, T. L. et TURNQUIST, H. R. (2015) New dog and new tricks: evolving roles for IL-33 in type 2 immunity. *J Leukoc Biol* 97 (6): 1037-1048.
- LU C., DIEHL, S. A., NOUBADE, R., LEDOUX, J., NELSON, M. T., SPACH, K., ZACHARY, J. F., BLANKENHORN, E. P. et TEUSCHER, C. (2010) Endothelial histamine H1 receptor signaling reduces blood-brain barrier permeability and susceptibility to autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (44): 18967-18972.
- LUBLIN F. D. (2005) Clinical features and diagnosis of multiple sclerosis. *Neurol Clin* 23 (1): 1-15, v.
- LUITEN P. G., TER HORST, G. J., KARST, H. et STEFFENS, A. B. (1985) The course of paraventricular hypothalamic efferents to autonomic structures in medulla and spinal cord. *Brain Res* 329 (1-2): 374-378.
- LUO C., JIAN, C., LIAO, Y., HUANG, Q., WU, Y., LIU, X. et ZOU, D. (2017) The role of microglia in multiple sclerosis. *Neuropsychiatr Dis Treat* 13 1661-1667.
- LUTHI A. U., CULLEN, S. P., MCNEELA, E. A., DURIEZ, P. J., AFONINA, I. S., SHERIDAN, C., BRUMATTI, G., TAYLOR, R. C., KERSSE, K., VANDENABEELE, P., LAVELLE, E. C. et MARTIN, S. J. (2009) Suppression of interleukin-33 bioactivity through proteolysis by apoptotic caspases. *Immunity* 31 (1): 84-98.
- MACCARTHY P. A., GROCOTT-MASON, R., PRENDERGAST, B. D. et SHAH, A. M. (2000) Contrasting inotropic effects of endogenous endothelin in the normal and failing human heart: studies with an intracoronary ET(A) receptor antagonist. *Circulation* 101 (2): 142-147.
- MACCUMBER M. W., ROSS, C. A. et SNYDER, S. H. (1990) Endothelin in brain: receptors, mitogenesis, and biosynthesis in glial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (6): 2359-2363.

- MACHLER P., WYSS, M. T., ELSAYED, M., STOBART, J., GUTIERREZ, R., VON FABER-CASTELL, A., KAELEN, V., ZUEND, M., SAN MARTIN, A., ROMERO-GOMEZ, I., BAEZA-LEHNERT, F., LENGACHER, S., SCHNEIDER, B. L., AEBISCHER, P., MAGISTRETTI, P. J., BARROS, L. F. et WEBER, B. (2016) In Vivo Evidence for a Lactate Gradient from Astrocytes to Neurons. *Cell Metab* 23 (1): 94-102.
- MACRAE I., ROBINSON, M., MCAULEY, M., REID, J. et MCCULLOCH, J. (1991) Effects of intracisternal endothelin-1 injection on blood flow to the lower brain stem. *Eur J Pharmacol* 203 (1): 85-91.
- MACVICAR B. A. et NEWMAN, E. A. (2015) Astrocyte regulation of blood flow in the brain. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7 (5):
- MAGNOTTI L. M., GOODENOUGH, D. A. et PAUL, D. L. (2011) Functional heterotypic interactions between astrocyte and oligodendrocyte connexins. *Glia* 59 (1): 26-34.
- MAHAD D. H., TRAPP, B. D. et LASSMANN, H. (2015) Pathological mechanisms in progressive multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 14 (2): 183-193.
- MANTOVANI A., SICA, A., SOZZANI, S., ALLAVENA, P., VECCHI, A. et LOCATI, M. (2004) The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 25 (12): 677-686.
- MARIEB E. N. (2005) Chapitre 14 : Le système nerveux autonome. Dans Éditions du Renouveau Pédagogique Inc (Éds). *Anatomie et physiologie humaines*. Québec (3e éd. 2005), 547-570.
- MARTIN N. T. et MARTIN, M. U. (2016) Interleukin 33 is a guardian of barriers and a local alarmin. *Nat Immunol* 17 (2): 122-131.
- MASAKI T. (2000) The endothelin family: an overview. *J Cardiovasc Pharmacol* 35 (4 Suppl 2): S3-5.
- MATSUMOTO H., SUZUKI, N., ONDA, H. et FUJINO, M. (1989) Abundance of endothelin-3 in rat intestine, pituitary gland and brain. *Biochem Biophys Res Commun* 164 (1): 74-80.
- MAURER M., WEDEMEYER, J., METZ, M., PILIPONSKY, A. M., WELLER, K., CHATTERJEA, D., CLOUTHIER, D. E., YANAGISAWA, M. M., TSAI, M. et GALLI, S. J. (2004) Mast cells promote homeostasis by limiting endothelin-1-induced toxicity. *Nature* 432 (7016): 512-516.
- MAURI C. et BOSMA, A. (2012) Immune regulatory function of B cells. *Annu Rev Immunol* 30 221-241.

- MCDUGALL A. J. et MCLEOD, J. G. (2003) Autonomic nervous system function in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 215 (1-2): 79-85.
- MCWHORTER F. Y., DAVIS, C. T. et LIU, W. F. (2015) Physical and mechanical regulation of macrophage phenotype and function. *Cell Mol Life Sci* 72 (7): 1303-1316.
- MEDIC N., VITA, F., ABBATE, R., SORANZO, M. R., PACOR, S., FABBRETTI, E., BORELLI, V. et ZABUCCHI, G. (2008) Mast cell activation by myelin through scavenger receptor. *J Neuroimmunol* 200 (1-2): 27-40.
- MEEPHANSAN J., TSUDA, H., KOMINE, M., TOMINAGA, S. et OHTSUKI, M. (2014) Regulation of IL-33 expression by IFN-gamma and tumor necrosis factor-alpha in normal human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* 132 (11): 2593-2600.
- MEHTA A. K., GRACIAS, D. T. et CROFT, M. (2018) TNF activity and T cells. *Cytokine* 101 14-18.
- MELLER D., BELLANDER, B. M., SCHMIDT-KASTNER, R. et INGVAR, M. (1993) Immunohistochemical studies with antibodies to neurofilament proteins on axonal damage in experimental focal lesions in rat. *J Neurol Sci* 117 (1-2): 164-174.
- MERCHAN P., BRIBIAN, A., SANCHEZ-CAMACHO, C., LEZAMETA, M., BOVOLENTA, P. et DE CASTRO, F. (2007) Sonic hedgehog promotes the migration and proliferation of optic nerve oligodendrocyte precursors. *Mol Cell Neurosci* 36 (3): 355-368.
- MESQUITA D., JR., CRUVINEL, W. M., CAMARA, N. O., KALLAS, E. G. et ANDRADE, L. E. (2009) Autoimmune diseases in the TH17 era. *Braz J Med Biol Res* 42 (6): 476-486.
- METCALFE D. D., BARAM, D. et MEKORI, Y. A. (1997) Mast cells. *Physiol Rev* 77 (4): 1033-1079.
- MICHEAU O. et TSCHOPP, J. (2003) Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 114 (2): 181-190.
- MILLER H. R. et PEMBERTON, A. D. (2002) Tissue-specific expression of mast cell granule serine proteinases and their role in inflammation in the lung and gut. *Immunology* 105 (4): 375-390.
- MILLER R. H. et RAFF, M. C. (1984) Fibrous and protoplasmic astrocytes are biochemically and developmentally distinct. *J Neurosci* 4 (2): 585-592.
- MILLER S. D., KARPUS, W. J. et DAVIDSON, T. S. (2007) Experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse. *Curr Protoc Immunol Chapter 15 Unit 15 11*.

- MILNER R., EDWARDS, G., STREULI, C. et FFRENCH-CONSTANT, C. (1996) A role in migration for the alpha V beta 1 integrin expressed on oligodendrocyte precursors. *J Neurosci* 16 (22): 7240-7252.
- MILOVANOVIC M., VOLAREVIC, V., LJUSIC, B., RADOSAVLJEVIC, G., JOVANOVIC, I., ARSENIJEVIC, N. et LUKIC, M. L. (2012) Deletion of IL-33R (ST2) abrogates resistance to EAE in BALB/C mice by enhancing polarization of APC to inflammatory phenotype. *PLoS One* 7 (9): e45225.
- MIMA T., YANAGISAWA, M., SHIGENO, T., SAITO, A., GOTO, K., TAKAKURA, K. et MASAKI, T. (1989) Endothelin acts in feline and canine cerebral arteries from the adventitial side. *Stroke* 20 (11): 1553-1556.
- MIRON V. E., BOYD, A., ZHAO, J. W., YUEN, T. J., RUCKH, J. M., SHADRACH, J. L., VAN WIJNGAARDEN, P., WAGERS, A. J., WILLIAMS, A., FRANKLIN, R. J. M. et FFRENCH-CONSTANT, C. (2013) M2 microglia and macrophages drive oligodendrocyte differentiation during CNS remyelination. *Nat Neurosci* 16 (9): 1211-1218.
- MITEW S., HAY, C. M., PECKHAM, H., XIAO, J., KOENNING, M. et EMERY, B. (2014) Mechanisms regulating the development of oligodendrocytes and central nervous system myelin. *Neuroscience* 276 29-47.
- MIYAMOTO Y., YAMAUCHI, J. et TANOUE, A. (2008) Cdk5 phosphorylation of WAVE2 regulates oligodendrocyte precursor cell migration through nonreceptor tyrosine kinase Fyn. *J Neurosci* 28 (33): 8326-8337.
- MIYAUCHI T. et MASAKI, T. (1999) Pathophysiology of endothelin in the cardiovascular system. *Annu Rev Physiol* 61 391-415.
- MIZEE M. R., NIJLAND, P. G., VAN DER POL, S. M., DREXHAGE, J. A., VAN HET HOF, B., MEBIUS, R., VAN DER VALK, P., VAN HORSSSEN, J., REIJERKERK, A. et DE VRIES, H. E. (2014) Astrocyte-derived retinoic acid: a novel regulator of blood-brain barrier function in multiple sclerosis. *Acta Neuropathol* 128 (5): 691-703.
- MOLOFSKY A. B., SAVAGE, A. K. et LOCKSLEY, R. M. (2015) Interleukin-33 in Tissue Homeostasis, Injury, and Inflammation. *Immunity* 42 (6): 1005-1019.
- MONACO C., NANCHAHAL, J., TAYLOR, P. et FELDMANN, M. (2015) Anti-TNF therapy: past, present and future. *Int Immunol* 27 (1): 55-62.
- MOREL L., CHIANG, M. S. R., HIGASHIMORI, H., SHONEYE, T., IYER, L. K., YELICK, J., TAI, A. et YANG, Y. (2017) Molecular and Functional Properties of Regional Astrocytes in the Adult Brain. *J Neurosci* 37 (36): 8706-8717.



- MORENO M., GUO, F., MILLS KO, E., BANNERMAN, P., SOULIKA, A. et PLEASURE, D. (2013) Origins and significance of astrogliosis in the multiple sclerosis model, MOG peptide EAE. *J Neurol Sci* 333 (1-2): 55-59.
- MORITZ D. R., RODEWALD, H. R., GHEYSELINCK, J. et KLEMENZ, R. (1998) The IL-1 receptor-related T1 antigen is expressed on immature and mature mast cells and on fetal blood mast cell progenitors. *J Immunol* 161 (9): 4866-4874.
- MORRISON R. S., SHARMA, A., DE VELLIS, J. et BRADSHAW, R. A. (1986) Basic fibroblast growth factor supports the survival of cerebral cortical neurons in primary culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83 (19): 7537-7541.
- MOSMANN T. R. et SAD, S. (1996) The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 17 (3): 138-146.
- MOSQUEDA-GARCIA R., INAGAMI, T., APPALSAMY, M., SUGIURA, M. et ROBERTSON, R. M. (1993) Endothelin as a neuropeptide. Cardiovascular effects in the brainstem of normotensive rats. *Circ Res* 72 (1): 20-35.
- MOSS M. L., JIN, S. L., MILLA, M. E., BICKETT, D. M., BURKHART, W., CARTER, H. L., CHEN, W. J., CLAY, W. C., DIDSBURY, J. R., HASSLER, D., HOFFMAN, C. R., KOST, T. A., LAMBERT, M. H., LEESNITZER, M. A., MCCAULEY, P., MCGEEHAN, G., MITCHELL, J., MOYER, M., PAHEL, G., ROCQUE, W., OVERTON, L. K., SCHOENEN, F., SEATON, T., SU, J. L., BECHERER, J. D. et ET AL. (1997) Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha. *Nature* 385 (6618): 733-736.
- MOUSSION C., ORTEGA, N. et GIRARD, J. P. (2008) The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: a novel 'alarmin'? *PLoS One* 3 (10): e3331.
- MSIF M. S. I. F. (2013) Atlas of MS 2013. Londre (Multiple Sclerosis International Federation 2013), paru en 1-28.
- MSSSTUDYGROUP, GROUP, T. L. M. S. S. et GROUP, T. U. O. B. C. M. M. A. (1999) TNF neutralization in MS: results of a randomized, placebo-controlled multicenter study. The Lenercept Multiple Sclerosis Study Group and The University of British Columbia MS/MRI Analysis Group. *Neurology* 53 (3): 457-465.
- MULLEN R. J., BUCK, C. R. et SMITH, A. M. (1992) NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* 116 (1): 201-211.
- MUNGER K. L., CHITNIS, T. et ASCHERIO, A. (2009) Body size and risk of MS in two cohorts of US women. *Neurology* 73 (19): 1543-1550.

- MUNGER K. L., BENTZEN, J., LAURSEN, B., STENAGER, E., KOCH-HENRIKSEN, N., SORESENSEN, T. I. et BAKER, J. L. (2013) Childhood body mass index and multiple sclerosis risk: a long-term cohort study. *Mult Scler* 19 (10): 1323-1329.
- MURAKAMI M., KARNIK, S. S. et HUSAIN, A. (1995) Human prochymase activation. A novel role for heparin in zymogen processing. *J Biol Chem* 270 (5): 2218-2223.
- MURPHY-ROYAL C., DUPUIS, J. P., VARELA, J. A., PANATIER, A., PINSON, B., BAUFRETON, J., GROG, L. et OLIET, S. H. (2015) Surface diffusion of astrocytic glutamate transporters shapes synaptic transmission. *Nat Neurosci* 18 (2): 219-226.
- MURRAY D. B., GARDNER, J. D., BROWER, G. L. et JANICKI, J. S. (2008) Effects of nonselective endothelin-1 receptor antagonism on cardiac mast cell-mediated ventricular remodeling in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294 (3): H1251-1257.
- NAEGELE M. et MARTIN, R. (2014) The good and the bad of neuroinflammation in multiple sclerosis. *Handb Clin Neurol* 122 59-87.
- NAGATA K., NAKAJIMA, K. et KOHSAKA, S. (1993a) Plasminogen promotes the development of rat mesencephalic dopaminergic neurons in vitro. *Brain Res Dev Brain Res* 75 (1): 31-37.
- NAGATA K., NAKAJIMA, K., TAKEMOTO, N., SAITO, H. et KOHSAKA, S. (1993b) Microglia-derived plasminogen enhances neurite outgrowth from explant cultures of rat brain. *Int J Dev Neurosci* 11 (2): 227-237.
- NAKAJIMA K., HONDA, S., TOHYAMA, Y., IMAI, Y., KOHSAKA, S. et KURIHARA, T. (2001) Neurotrophin secretion from cultured microglia. *J Neurosci Res* 65 (4): 322-331.
- NATARAJAN C., YAO, S. Y. et SRIRAM, S. (2016) TLR3 Agonist Poly-IC Induces IL-33 and Promotes Myelin Repair. *PLoS One* 11 (3): e0152163.
- NAUTIYAL K. M., DAILEY, C. A., JAHN, J. L., RODRIQUEZ, E., SON, N. H., SWEEDLER, J. V. et SILVER, R. (2012) Serotonin of mast cell origin contributes to hippocampal function. *Eur J Neurosci* 36 (3): 2347-2359.
- NAWAZ S., SANCHEZ, P., SCHMITT, S., SNAIDERO, N., MITKOVSKI, M., VELTE, C., BRUCKNER, B. R., ALEXOPOULOS, I., CZOPKA, T., JUNG, S. Y., RHEE, J. S., JANSHOFF, A., WITKE, W., SCHAAP, I. A. T., LYONS, D. A. et SIMONS, M. (2015) Actin filament turnover drives leading edge growth during myelin sheath formation in the central nervous system. *Dev Cell* 34 (2): 139-151.
- NELISSEN S., LEMMENS, E., GEURTS, N., KRAMER, P., MAURER, M., HENDRIKS, J. et HENDRIX, S. (2013) The role of mast cells in neuroinflammation. *Acta Neuropathol* 125 (5): 637-650.

- NERY S., WICHTERLE, H. et FISHELL, G. (2001) Sonic hedgehog contributes to oligodendrocyte specification in the mammalian forebrain. *Development* 128 (4): 527-540.
- NICHOLS N. R., DAY, J. R., LAPING, N. J., JOHNSON, S. A. et FINCH, C. E. (1993) GFAP mRNA increases with age in rat and human brain. *Neurobiol Aging* 14 (5): 421-429.
- NIMMERJAHN A., KIRCHHOFF, F. et HELMCHEN, F. (2005) Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308 (5726): 1314-1318.
- NIU J., LI, T., YI, C., HUANG, N., KOULAKOFF, A., WENG, C., LI, C., ZHAO, C. J., GIAUME, C. et XIAO, L. (2016) Connexin-based channels contribute to metabolic pathways in the oligodendroglial lineage. *J Cell Sci* 129 (9): 1902-1914.
- NIWA M., KAWAGUCHI, T., HIMENO, A., FUJIMOTO, M., KURIHARA, M., YAMASHITA, K., KATAOKA, Y., SHIGEMATSU, K. et TANIYAMA, K. (1992) Specific binding sites for 125I-endothelin-1 in the porcine and human spinal cord. *Eur J Pharmacol* 225 (4): 281-289.
- NOMURA K., KOJIMA, T., FUCHIMOTO, J., OBATA, K., KEIRA, T., HIMI, T. et SAWADA, N. (2012) Regulation of interleukin-33 and thymic stromal lymphopoietin in human nasal fibroblasts by proinflammatory cytokines. *Laryngoscope* 122 (6): 1185-1192.
- OBERHEIM N. A., WANG, X., GOLDMAN, S. et NEDERGAARD, M. (2006) Astrocytic complexity distinguishes the human brain. *Trends Neurosci* 29 (10): 547-553.
- O'BRIEN K., GRAN, B. et ROSTAMI, A. (2010) T-cell based immunotherapy in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Immunotherapy* 2 (1): 99-115.
- O'CONNOR P. W. et OH, J. (2014) Disease-modifying agents in multiple sclerosis. *Handb Clin Neurol* 122 465-501.
- ODOARDI F., SIE, C., STREYL, K., ULAGANATHAN, V. K., SCHLAGER, C., LODYGIN, D., HECKELSMILLER, K., NIETFELD, W., ELLWART, J., KLINKERT, W. E., LOTTAZ, C., NOSOV, M., BRINKMANN, V., SPANG, R., LEHRACH, H., VINGRON, M., WEKERLE, H., FLUGEL-KOCH, C. et FLUGEL, A. (2012) T cells become licensed in the lung to enter the central nervous system. *Nature* 488 (7413): 675-679.
- OHSAWA K., IMAI, Y., SASAKI, Y. et KOHSAKA, S. (2004) Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbrin and enhances its actin-bundling activity. *J Neurochem* 88 (4): 844-856.
- OHTSU H., TANAKA, S., TERUI, T., HORI, Y., MAKABE-KOBAYASHI, Y., PEJLER, G., TCHOUGOUNOVA, E., HELLMAN, L., GERTSENSTEIN, M., HIRASAWA, N., SAKURAI, E., BUZAS, E., KOVACS, P., CSABA, G., KITTEL, A., OKADA, M., HARA, M., MAR, L., NUMAYAMA-TSURUTA, K., ISHIGAKI-SUZUKI, S., OHUCHI, K., ICHIKAWA, A., FALUS,

- A., WATANABE, T. et NAGY, A. (2001) Mice lacking histidine decarboxylase exhibit abnormal mast cells. *FEBS Lett* 502 (1-2): 53-56.
- OKUDA Y., OKUDA, M. et BERNARD, C. C. (2002) Gender does not influence the susceptibility of C57BL/6 mice to develop chronic experimental autoimmune encephalomyelitis induced by myelin oligodendrocyte glycoprotein. *Immunol Lett* 81 (1): 25-29.
- ONO N. et KANEKO, M. (1995) Influences of beta-blocking agents on cardiovascular actions induced by endothelin-3 administered intracerebroventricularly in anesthetized rats. *Life Sci* 57 (4): 345-353.
- ORENTAS D. M., HAYES, J. E., DYER, K. L. et MILLER, R. H. (1999) Sonic hedgehog signaling is required during the appearance of spinal cord oligodendrocyte precursors. *Development* 126 (11): 2419-2429.
- OSHIKAWA K., KUROIWA, K., TAGO, K., IWAHANA, H., YANAGISAWA, K., OHNO, S., TOMINAGA, S. I. et SUGIYAMA, Y. (2001) Elevated soluble ST2 protein levels in sera of patients with asthma with an acute exacerbation. *Am J Respir Crit Care Med* 164 (2): 277-281.
- OSTERHOUT D. J., EBNER, S., XU, J., ORNITZ, D. M., ZAZANIS, G. A. et MCKINNON, R. D. (1997) Transplanted oligodendrocyte progenitor cells expressing a dominant-negative FGF receptor transgene fail to migrate in vivo. *J Neurosci* 17 (23): 9122-9132.
- OUCHI Y., KIM, S., SOUZA, A. C., IJIMA, S., HATTORI, A., ORIMO, H., YOSHIKUMI, M., KURIHARA, H. et YAZAKI, Y. (1989) Central effect of endothelin on blood pressure in conscious rats. *Am J Physiol* 256 (6 Pt 2): H1747-1751.
- PALLE P., MONAGHAN, K. L., MILNE, S. M. et WAN, E. C. K. (2017) Cytokine Signaling in Multiple Sclerosis and Its Therapeutic Applications. *Med Sci (Basel)* 5 (4):
- PANNASCH U. et ROUACH, N. (2013) Emerging role for astroglial networks in information processing: from synapse to behavior. *Trends Neurosci* 36 (7): 405-417.
- PANNETON W. M. et LOEWY, A. D. (1980) Projections of the carotid sinus nerve to the nucleus of the solitary tract in the cat. *Brain Res* 191 (1): 239-244.
- PAOLICELLI R. C., BOLASCO, G., PAGANI, F., MAGGI, L., SCIANNI, M., PANZANELLI, P., GIUSTETTO, M., FERREIRA, T. A., GUIDUCCI, E., DUMAS, L., RAGOZZINO, D. et GROSS, C. T. (2011) Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science* 333 (6048): 1456-1458.
- PAPENFUSS T. L., ROGERS, C. J., GIENAPP, I., YURRITA, M., MCCLAIN, M., DAMICO, N., VALO, J., SONG, F. et WHITACRE, C. C. (2004) Sex differences in experimental

- autoimmune encephalomyelitis in multiple murine strains. *J Neuroimmunol* 150 (1-2): 59-69.
- PARENICA J., MALASKA, J., JARKOVSKY, J., LIPKOVA, J., DASTYCH, M., HELANOVA, K., LITZMAN, J., TOMANDL, J., LITTNEROVA, S., SEVCIKOVA, J., GAL, R., SEVCIK, P., SPINAR, J. et GOLDBERGOVA, M. P. (2012) Soluble ST2 levels in patients with cardiogenic and septic shock are not predictors of mortality. *Exp Clin Cardiol* 17 (4): 205-209.
- PARK I. H., PARK, J. H., SHIN, J. M. et LEE, H. M. (2016) Tumor necrosis factor- $\alpha$  regulates interleukin-33 expression through extracellular signal-regulated kinase, p38, and nuclear factor- $\kappa$ B pathways in airway epithelial cells. *Int Forum Allergy Rhinol* 6 (9): 973-980.
- PARKHURST C. N., YANG, G., NINAN, I., SAVAS, J. N., YATES, J. R., 3RD, LAFAILLE, J. J., HEMPSTEAD, B. L., LITTMAN, D. R. et GAN, W. B. (2013) Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. *Cell* 155 (7): 1596-1609.
- PASCUAL O., CASPER, K. B., KUBERA, C., ZHANG, J., REVILLA-SANCHEZ, R., SUL, J. Y., TAKANO, H., MOSS, S. J., MCCARTHY, K. et HAYDON, P. G. (2005) Astrocytic purinergic signaling coordinates synaptic networks. *Science* 310 (5745): 113-116.
- PASPARAKIS M. et VANDENABEELE, P. (2015) Necroptosis and its role in inflammation. *Nature* 517 (7534): 311-320.
- PASTORELLI L., GARG, R. R., HOANG, S. B., SPINA, L., MATTIOLI, B., SCARPA, M., FIOCCHI, C., VECCHI, M. et PIZARRO, T. T. (2010) Epithelial-derived IL-33 and its receptor ST2 are dysregulated in ulcerative colitis and in experimental Th1/Th2 driven enteritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (17): 8017-8022.
- PATTEN S. B., BECK, C. A., WILLIAMS, J. V., BARBUI, C. et METZ, L. M. (2003) Major depression in multiple sclerosis: a population-based perspective. *Neurology* 61 (11): 1524-1527.
- PATZIG J., ERWIG, M. S., TENZER, S., KUSCH, K., DIBAJ, P., MOBIUS, W., GOEBBELS, S., SCHAEREN-WIEMERS, N., NAVE, K. A. et WERNER, H. B. (2016) Septin/anillin filaments scaffold central nervous system myelin to accelerate nerve conduction. *Elife* 5
- PAYNE N., SIATSKAS, C., BARNARD, A. et BERNARD, C. C. (2011) The prospect of stem cells as multi-faceted purveyors of immune modulation, repair and regeneration in multiple sclerosis. *Curr Stem Cell Res Ther* 6 (1): 50-62.

- PEDRAZA L., HUANG, J. K. et COLMAN, D. (2009) Disposition of axonal caspr with respect to glial cell membranes: Implications for the process of myelination. *J Neurosci Res* 87 (15): 3480-3491.
- PEINE M., MAREK, R. M. et LOHNING, M. (2016) IL-33 in T Cell Differentiation, Function, and Immune Homeostasis. *Trends Immunol* 37 (5): 321-333.
- PEJLER G., ABRINK, M., RINGVALL, M. et WERNERSSON, S. (2007) Mast cell proteases. *Adv Immunol* 95 167-255.
- PEJLER G., RONNBERG, E., WAERN, I. et WERNERSSON, S. (2010) Mast cell proteases: multifaceted regulators of inflammatory disease. *Blood* 115 (24): 4981-4990.
- PELLERIN L., BOUZIER-SORE, A. K., AUBERT, A., SERRES, S., MERLE, M., COSTALAT, R. et MAGISTRETTI, P. J. (2007) Activity-dependent regulation of energy metabolism by astrocytes: an update. *Glia* 55 (12): 1251-1262.
- PEREA G. et ARAQUE, A. (2005) Properties of synaptically evoked astrocyte calcium signal reveal synaptic information processing by astrocytes. *J Neurosci* 25 (9): 2192-2203.
- PERRY V. H., HUME, D. A. et GORDON, S. (1985) Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain. *Neuroscience* 15 (2): 313-326.
- PERRY V. H. et GORDON, S. (1988) Macrophages and microglia in the nervous system. *Trends Neurosci* 11 (6): 273-277.
- PHILIPS T. et ROTHSTEIN, J. D. (2017) Oligodendroglia: metabolic supporters of neurons. *J Clin Invest* 127 (9): 3271-3280.
- PIATON G., AIGROT, M. S., WILLIAMS, A., MOYON, S., TEPAVCEVIC, V., MOUTKINE, I., GRAS, J., MATHO, K. S., SCHMITT, A., SOELLNER, H., HUBER, A. B., RAVASSARD, P. et LUBETZKI, C. (2011) Class 3 semaphorins influence oligodendrocyte precursor recruitment and remyelination in adult central nervous system. *Brain* 134 (Pt 4): 1156-1167.
- PICHERY M., MIREY, E., MERCIER, P., LEFRANCAIS, E., DUJARDIN, A., ORTEGA, N. et GIRARD, J. P. (2012) Endogenous IL-33 is highly expressed in mouse epithelial barrier tissues, lymphoid organs, brain, embryos, and inflamed tissues: in situ analysis using a novel Il-33-LacZ gene trap reporter strain. *J Immunol* 188 (7): 3488-3495.
- PICONESE S., COSTANZA, M., MUSIO, S., TRIPODO, C., POLIANI, P. L., GRI, G., BUROCCHI, A., PITTONI, P., GORZANELLI, A., COLOMBO, M. P. et PEDOTTI, R. (2011) Exacerbated experimental autoimmune encephalomyelitis in mast-cell-deficient Kit W-sh/W-sh mice. *Lab Invest* 91 (4): 627-641.

- PILIPONSKY A. M., CHEN, C. C., RIOS, E. J., TREUTING, P. M., LAHIRI, A., ABRINK, M., PEJLER, G., TSAI, M. et GALLI, S. J. (2012) The chymase mouse mast cell protease 4 degrades TNF, limits inflammation, and promotes survival in a model of sepsis. *Am J Pathol* 181 (3): 875-886.
- PLEMEL J. R., LIU, W. Q. et YONG, V. W. (2017) Remyelination therapies: a new direction and challenge in multiple sclerosis. *Nat Rev Drug Discov* 16 (9): 617-634.
- POBER J. S. et COTRAN, R. S. (1990) Cytokines and endothelial cell biology. *Physiol Rev* 70 (2): 427-451.
- PONATH G., PARK, C. et PITT, D. (2018) The Role of Astrocytes in Multiple Sclerosis. *Front Immunol* 9 217.
- POULAT P., D'ORLEANS-JUSTE, P., DE CHAMPLAIN, J., YANO, M. et COUTURE, R. (1994) Cardiovascular effects of intrathecally administered endothelins and big endothelin-1 in conscious rats: receptor characterization and mechanism of action. *Brain Res* 648 (2): 239-248.
- POULAT P. et COUTURE, R. (1998) Increased pulmonary vascular permeability and oedema induced by intrathecally injected endothelins in rat. *Eur J Pharmacol* 344 (2-3): 251-259.
- PREFONTAINE D., LAJOIE-KADOCH, S., FOLEY, S., AUDUSSEAU, S., OLIVENSTEIN, R., HALAYKO, A. J., LEMIERE, C., MARTIN, J. G. et HAMID, Q. (2009) Increased expression of IL-33 in severe asthma: evidence of expression by airway smooth muscle cells. *J Immunol* 183 (8): 5094-5103.
- PREFONTAINE D., NADIGEL, J., CHOUIALI, F., AUDUSSEAU, S., SEMLALI, A., CHAKIR, J., MARTIN, J. G. et HAMID, Q. (2010) Increased IL-33 expression by epithelial cells in bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol* 125 (3): 752-754.
- PRESTOZ L., CHATZOPOULOU, E., LEMKINE, G., SPASSKY, N., LEBRAS, B., KAGAWA, T., IKENAKA, K., ZALC, B. et THOMAS, J. L. (2004) Control of axonophilic migration of oligodendrocyte precursor cells by Eph-ephrin interaction. *Neuron Glia Biol* 1 (1): 73-83.
- PROBERT L. (2015) TNF and its receptors in the CNS: The essential, the desirable and the deleterious effects. *Neuroscience* 302 2-22.
- RANG H. P., RITTER, J. M., FLOWER, R. J. et HENDERSON, G. (2016a) Chapter 13: Cholinergic transmission. Dans *Elvsevier Churchill Livingstone* (Éds). Rang and Dale's pharmacology. (8th edition), 155-176.

- RANG H. P., RITTER, J. M., FLOWER, R. J. et HENDERSON, G. (2016b) Chapter 12: Chemical mediators and the autonomic nervous system. Dans Elvsevier Churchill Livingstone (Éds). Rang and Dale's pharmacology. (8th edition), 142-154.
- RANG H. P., RITTER, J. M., FLOWER, R. J. et HENDERSON, G. (2016c) Chapter 14: Noradrenergic transmission. Dans Elvsevier Churchill Livingstone (Éds). Rang and Dale's pharmacology. (8th edition), 177-196.
- RANK M. A., KOBAYASHI, T., KOZAKI, H., BARTEMES, K. R., SQUILLACE, D. L. et KITA, H. (2009) IL-33-activated dendritic cells induce an atypical TH2-type response. *J Allergy Clin Immunol* 123 (5): 1047-1054.
- RAO K. N. et BROWN, M. A. (2008) Mast cells: multifaceted immune cells with diverse roles in health and disease. *Ann N Y Acad Sci* 1143 83-104.
- REBELLO S., ROY, S., SAXENA, P. R. et GULATI, A. (1995) Systemic hemodynamic and regional circulatory effects of centrally administered endothelin-1 are mediated through ETA receptors. *Brain Res* 676 (1): 141-150.
- REDMOND S. A., MEI, F., ESHED-EISENBACH, Y., OSSO, L. A., LESHKOWITZ, D., SHEN, Y. A., KAY, J. N., AURRAND-LIONS, M., LYONS, D. A., PELES, E. et CHAN, J. R. (2016) Somatodendritic Expression of JAM2 Inhibits Oligodendrocyte Myelination. *Neuron* 91 (4): 824-836.
- REICH D. S., LUCCHINETTI, C. F. et CALABRESI, P. A. (2018) Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* 378 (2): 169-180.
- REIJERKERK A., LAKEMAN, K. A., DREXHAGE, J. A., VAN HET HOF, B., VAN WIJCK, Y., VAN DER POL, S. M., KOOL, G., GEERTS, D. et DE VRIES, H. E. (2012) Brain endothelial barrier passage by monocytes is controlled by the endothelin system. *J Neurochem* 121 (5): 730-737.
- REVERCHON F., MORTAUD, S., SIVOYON, M., MAILLET, I., LAUGERAY, A., PALOMO, J., MONTECOT, C., HERZINE, A., MEME, S., MEME, W., ERARD, F., RYFFEL, B., MENUET, A. et QUESNIAUX, V. F. J. (2017) IL-33 receptor ST2 regulates the cognitive impairments associated with experimental cerebral malaria. *PLoS Pathog* 13 (4): e1006322.
- RIBATTI D. (2015) The crucial role of mast cells in blood-brain barrier alterations. *Exp Cell Res* 338 (1): 119-125.
- RICHARDSON W. D., KESSARIS, N. et PRINGLE, N. (2006) Oligodendrocyte wars. *Nat Rev Neurosci* 7 (1): 11-18.
- RIISE T., NORTVEDT, M. W. et ASCHERIO, A. (2003) Smoking is a risk factor for multiple sclerosis. *Neurology* 61 (8): 1122-1124.



- RILEY J. F. et WEST, G. B. (1952) Histamine in tissue mast cells. *J Physiol* 117 (4): 72P-73P.
- RINHOLM J. E., HAMILTON, N. B., KESSARIS, N., RICHARDSON, W. D., BERGERSEN, L. H. et ATTWELL, D. (2011) Regulation of oligodendrocyte development and myelination by glucose and lactate. *J Neurosci* 31 (2): 538-548.
- RISHER W. C. et EROGLU, C. (2012) Thrombospondins as key regulators of synaptogenesis in the central nervous system. *Matrix Biol* 31 (3): 170-177.
- ROSATI G. (2001) The prevalence of multiple sclerosis in the world: an update. *Neurol Sci* 22 (2): 117-139.
- ROSSLER U., THOMASSEN, E., HULTNER, L., BAIER, S., DANESCU, J. et WERENSKIOLD, A. K. (1995) Secreted and membrane-bound isoforms of T1, an orphan receptor related to IL-1-binding proteins, are differently expressed in vivo. *Dev Biol* 168 (1): 86-97.
- ROSTAMI A. et CIRIC, B. (2013) Role of Th17 cells in the pathogenesis of CNS inflammatory demyelination. *J Neurol Sci* 333 (1-2): 76-87.
- ROTHSTEIN J. D., DYKES-HOBERG, M., PARDO, C. A., BRISTOL, L. A., JIN, L., KUNCL, R. W., KANAI, Y., HEDIGER, M. A., WANG, Y., SCHIELKE, J. P. et WELTY, D. F. (1996) Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 16 (3): 675-686.
- ROUACH N., KOULAKOFF, A., ABUDARA, V., WILLECKE, K. et GIAUME, C. (2008) Astroglial metabolic networks sustain hippocampal synaptic transmission. *Science* 322 (5907): 1551-1555.
- ROUSSEL L., ERARD, M., CAYROL, C. et GIRARD, J. P. (2008) Molecular mimicry between IL-33 and KSHV for attachment to chromatin through the H2A-H2B acidic pocket. *EMBO Rep* 9 (10): 1006-1012.
- ROVIRA A., WATTJES, M. P., TINTORE, M., TUR, C., YOUSRY, T. A., SORMANI, M. P., DE STEFANO, N., FILIPPI, M., AUGER, C., ROCCA, M. A., BARKHOF, F., FAZEKAS, F., KAPPOS, L., POLMAN, C., MILLER, D. et MONTALBAN, X. (2015) Evidence-based guidelines: MAGNIMS consensus guidelines on the use of MRI in multiple sclerosis-clinical implementation in the diagnostic process. *Nat Rev Neurol* 11 (8): 471-482.
- ROY A., GANESH, G., SIPPOLA, H., BOLIN, S., SAWESI, O., DAGALV, A., SCHLENNER, S. M., FEYERABEND, T., RODEWALD, H. R., KJELLEN, L., HELLMAN, L. et ABRINK, M. (2014) Mast cell chymase degrades the alarmins heat shock protein 70, biglycan, HMGB1, and interleukin-33 (IL-33) and limits danger-induced inflammation. *J Biol Chem* 289 (1): 237-250.

- ROZNIECKI J. J., HAUSER, S. L., STEIN, M., LINCOLN, R. et THEOHARIDES, T. C. (1995) Elevated mast cell tryptase in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *Ann Neurol* 37 (1): 63-66.
- RUBANYI G. M. et POLOKOFF, M. A. (1994) Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacol Rev* 46 (3): 325-415.
- RUCKH J. M., ZHAO, J. W., SHADRACH, J. L., VAN WIJNGAARDEN, P., RAO, T. N., WAGERS, A. J. et FRANKLIN, R. J. (2012) Rejuvenation of regeneration in the aging central nervous system. *Cell Stem Cell* 10 (1): 96-103.
- RUSSI A. E., WALKER-CAULFIELD, M. E. et BROWN, M. A. (2016) Mast cell inflammasome activity in the meninges regulates EAE disease severity. *Clin Immunol* 189 14-22.
- RYMO S. F., GERHARDT, H., WOLFHAGEN SAND, F., LANG, R., UV, A. et BETSHOLTZ, C. (2011) A two-way communication between microglial cells and angiogenic sprouts regulates angiogenesis in aortic ring cultures. *PLoS One* 6 (1): e15846.
- SAAB A. S., TZVETAVONA, I. D., TREVISIOL, A., BALTAN, S., DIBAJ, P., KUSCH, K., MOBIUS, W., GOETZE, B., JAHN, H. M., HUANG, W., STEFFENS, H., SCHOMBURG, E. D., PEREZ-SAMARTIN, A., PEREZ-CERDA, F., BAKHTIARI, D., MATUTE, C., LOWEL, S., GRIESINGER, C., HIRRLINGER, J., KIRCHHOFF, F. et NAVE, K. A. (2016) Oligodendroglial NMDA Receptors Regulate Glucose Import and Axonal Energy Metabolism. *Neuron* 91 (1): 119-132.
- SAGHER O., JIN, Y., THAI, Q. A., FERGUS, A., KASSELL, N. F. et LEE, K. S. (1994) Cerebral microvascular responses to endothelins: the role of ETA receptors. *Brain Res* 658 (1-2): 179-184.
- SAKURAI T., YANAGISAWA, M., TAKUWA, Y., MIYAZAKI, H., KIMURA, S., GOTO, K. et MASAKI, T. (1990) Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature* 348 (6303): 732-735.
- SANOFI-GENZYME S. E. (2018) La prise en charge non-médicamenteuse de la SEP. <https://www.sep-ensemble.fr/traitements-parcours-de-soin/prise-en-charge-non-medicamenteuse-sclerose-en-plaques>, 05-décembre-2017.
- SAWADA M., KONDO, N., SUZUMURA, A. et MARUNOUCHI, T. (1989) Production of tumor necrosis factor-alpha by microglia and astrocytes in culture. *Brain Res* 491 (2): 394-397.
- SAWCER S., FRANKLIN, R. J. et BAN, M. (2014) Multiple sclerosis genetics. *Lancet Neurol* 13 (7): 700-709.

- SAYED B. A., CHRISTY, A. L., WALKER, M. E. et BROWN, M. A. (2010) Meningeal mast cells affect early T cell central nervous system infiltration and blood-brain barrier integrity through TNF: a role for neutrophil recruitment? *J Immunol* 184 (12): 6891-6900.
- SAYED B. A., WALKER, M. E. et BROWN, M. A. (2011) Cutting edge: mast cells regulate disease severity in a relapsing-remitting model of multiple sclerosis. *J Immunol* 186 (6): 3294-3298.
- SCHAFER D. P., LEHRMAN, E. K., KAUTZMAN, A. G., KOYAMA, R., MARDINLY, A. R., YAMASAKI, R., RANSOHOFF, R. M., GREENBERG, M. E., BARRES, B. A. et STEVENS, B. (2012) Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron* 74 (4): 691-705.
- SCHMIDT A., OBERLE, N. et KRAMMER, P. H. (2012) Molecular mechanisms of treg-mediated T cell suppression. *Front Immunol* 3 51.
- SCHMITZ J., OWYANG, A., OLDHAM, E., SONG, Y., MURPHY, E., MCCLANAHAN, T. K., ZURAWSKI, G., MOSHREFI, M., QIN, J., LI, X., GORMAN, D. M., BAZAN, J. F. et KASTELEIN, R. A. (2005) IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity* 23 (5): 479-490.
- SCHNADELBACH O., BLASCHUK, O. W., SYMONDS, M., GOUR, B. J., DOHERTY, P. et FAWCETT, J. W. (2000) N-cadherin influences migration of oligodendrocytes on astrocyte monolayers. *Mol Cell Neurosci* 15 (3): 288-302.
- SCSP S. C. D. S. E. P. (2018a) Qu'est-ce que la SP ? <https://scleroseenplaques.ca/a-propos-de-la-sp/quest-ce-que-la-sp>, 05-décembre-2017.
- SCSP S. C. D. S. E. P. (2018b) Formes. <https://scleroseenplaques.ca/a-propos-de-la-sp/formes>, 05-décembre-2017.
- SCSP S. C. D. S. E. P. (2018c) Médicaments. <https://scleroseenplaques.ca/prise-en-charge-de-la-sp/traitements/medicaments>, 05-décembre-2017.
- SCSP S. C. D. S. E. P. (2018d) Médicaments modificateurs de l'évolution de la maladie. <https://scleroseenplaques.ca/prise-en-charge-de-la-sp/traitements/medicaments/medicaments-modificateurs-de-levolution-de-la-maladie-immunomodulateurs>, 05-décembre-2017.
- SCSP S. C. D. S. E. P. (2018e) SP progressive. <https://scleroseenplaques.ca/prise-en-charge-de-la-sp/vivre-avec-la-sp/sp-progressive>, 05-décembre-2017.
- SCSP S. C. D. S. E. P. (2018f) Traitements à l'étude. <https://scleroseenplaques.ca/nouvelles-sur-la-recherche/traitements-a-letude>, 05-décembre-2017.

- SCSP S. C. D. S. E. P. (2018g) Cellules souches. <https://scleroseenplaques.ca/sujets-dactualite/cellules-souches>, 05-décembre-2017.
- SCSP S. C. D. S. E. P. (2018h) Nouvelles récentes sur la recherche en SP. <https://scleroseenplaques.ca/nouvelles-sur-la-recherche/article/une-etude-subventionnee-par-la-fondation-pour-la-recherche-scientifique-sur-la-sp-revele-que-la-minocycline-antibiotique-oral-reduit-le-risque-devolution-vers-la-sp>, 05-décembre-2017.
- SCSP S. C. D. S. E. P. (2018i) Traitements complémentaires et parallèles. <https://scleroseenplaques.ca/prise-en-charge-de-la-sp/traitements/traitements-complementaires-et-paralleles>, 09-septembre-2018.
- SECOR V. H., SECOR, W. E., GUTEKUNST, C. A. et BROWN, M. A. (2000) Mast cells are essential for early onset and severe disease in a murine model of multiple sclerosis. *J Exp Med* 191 (5): 813-822.
- SELLNER S., PARICIO-MONTESINOS, R., SPIESS, A., MASUCH, A., ERNY, D., HARSAN, L. A., ELVERFELDT, D. V., SCHWABENLAND, M., BIBER, K., STASZEWSKI, O., LIRA, S., JUNG, S., PRINZ, M. et BLANK, T. (2016) Microglial CX3CR1 promotes adult neurogenesis by inhibiting Sirt 1/p65 signaling independent of CX3CL1. *Acta Neuropathol Commun* 4 (1): 102.
- SEMAAN W., DESBIENS, L., HOUDE, M., LABONTE, J., GAGNON, H., YAMAMOTO, D., TAKAI, S., LAIDLAW, T., BKAILY, G., SCHWERTANI, A., PEJLER, G., LEVESQUE, C., DESJARDINS, R., DAY, R. et D'ORLEANS-JUSTE, P. (2015) Chymase inhibitor-sensitive synthesis of endothelin-1 (1-31) by recombinant mouse mast cell protease 4 and human chymase. *Biochem Pharmacol* 94 (2): 91-100.
- SEWELL D. L., REINKE, E. K., HOGAN, L. H., SANDOR, M. et FABRY, Z. (2002) Immunoregulation of CNS autoimmunity by helminth and mycobacterial infections. *Immunol Lett* 82 (1-2): 101-110.
- SHAHER S. L. et SHAHER, A. (1999) Spinal Pharmacokinetics. Dans T.L. Yaksh (Éds). *Spinal Drug Delivery*. Amsterdam (1st ed.), 271-295.
- SHARKEY J. et BUTCHER, S. P. (1995) Characterisation of an experimental model of stroke produced by intracerebral microinjection of endothelin-1 adjacent to the rat middle cerebral artery. *J Neurosci Methods* 60 (1-2): 125-131.
- SHARMA K., SCHMITT, S., BERGNER, C. G., TYANOVA, S., KANNAIYAN, N., MANRIQUE-HOYOS, N., KONGI, K., CANTUTI, L., HANISCH, U. K., PHILIPS, M. A., ROSSNER, M. J., MANN, M. et SIMONS, M. (2015) Cell type- and brain region-resolved mouse brain proteome. *Nat Neurosci* 18 (12): 1819-1831.

- SHIMOJO M., NAKAJIMA, K., TAKEI, N., HAMANOUE, M. et KOHSAKA, S. (1991) Production of basic fibroblast growth factor in cultured rat brain microglia. *Neurosci Lett* 123 (2): 229-231.
- SHIMPO M., MORROW, D. A., WEINBERG, E. O., SABATINE, M. S., MURPHY, S. A., ANTMAN, E. M. et LEE, R. T. (2004) Serum levels of the interleukin-1 receptor family member ST2 predict mortality and clinical outcome in acute myocardial infarction. *Circulation* 109 (18): 2186-2190.
- SHIN T., KANG, B., TANUMA, N., MATSUMOTO, Y., WIE, M., AHN, M. et KANG, J. (2001) Intrathecal administration of endothelin-1 receptor antagonist ameliorates autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats. *Neuroreport* 12 (7): 1465-1468.
- SHINYAMA H., UCHIDA, T., KIDO, H., HAYASHI, K., WATANABE, M., MATSUMURA, Y., IKEGAWA, R., TAKAOKA, M. et MORIMOTO, S. (1991) Phosphoramidon inhibits the conversion of intracisternally administered big endothelin-1 to endothelin-1. *Biochem Biophys Res Commun* 178 (1): 24-30.
- SIERRA A., ENCINAS, J. M., DEUDERO, J. J., CHANCEY, J. H., ENIKOLOPOV, G., OVERSTREET-WADICHE, L. S., TSIRKA, S. E. et MALETIC-SAVATIC, M. (2010) Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. *Cell Stem Cell* 7 (4): 483-495.
- SILLER N., KUHLE, J., MUTHURAMAN, M., BARRO, C., UPHAUS, T., GROPPA, S., KAPPOS, L., ZIPP, F. et BITTNER, S. (2018) Serum neurofilament light chain is a biomarker of acute and chronic neuronal damage in early multiple sclerosis. *Mult Scler* 1352458518765666.
- SILVER R., SILVERMAN, A. J., VITKOVIC, L. et LEDERHENDLER, II (1996) Mast cells in the brain: evidence and functional significance. *Trends Neurosci* 19 (1): 25-31.
- SILVER R. et CURLEY, J. P. (2013) Mast cells on the mind: new insights and opportunities. *Trends Neurosci* 36 (9): 513-521.
- SILVERMAN A. J., SUTHERLAND, A. K., WILHELM, M. et SILVER, R. (2000) Mast cells migrate from blood to brain. *J Neurosci* 20 (1): 401-408.
- SIMARD E., JIN, D., TAKAI, S., MIYAZAKI, M., BROCHU, I. et D'ORLEANS-JUSTE, P. (2009) Chymase-dependent conversion of Big endothelin-1 in the mouse in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 328 (2): 540-548.
- SIMONS M., KRAMER, E. M., THIELE, C., STOFFEL, W. et TROTTER, J. (2000) Assembly of myelin by association of proteolipid protein with cholesterol- and galactosylceramide-rich membrane domains. *J Cell Biol* 151 (1): 143-154.

- SIMONS M. et NAVE, K. A. (2016) Oligodendrocytes: Myelination and Axonal Support. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8 (1): a020479.
- SIMONSON M. S. et DUNN, M. J. (1990) Cellular signaling by peptides of the endothelin gene family. *Faseb J* 4 (12): 2989-3000.
- SINGH S. K., STOGSDILL, J. A., PULIMOOD, N. S., DINGSDALE, H., KIM, Y. H., PILAZ, L. J., KIM, I. H., MANHAES, A. C., RODRIGUES, W. S., JR., PAMUKCU, A., ENUSTUN, E., ERTUZ, Z., SCHEIFFELE, P., SODERLING, S. H., SILVER, D. L., JI, R. R., MEDINA, A. E. et EROGLU, C. (2016) Astrocytes Assemble Thalamocortical Synapses by Bridging NRX1alpha and NL1 via Hevin. *Cell* 164 (1-2): 183-196.
- SIRAGANIAN R. P. (2003) Mast cell signal transduction from the high-affinity IgE receptor. *Curr Opin Immunol* 15 (6): 639-646.
- SKAPER S. D., GIUSTI, P. et FACCI, L. (2012) Microglia and mast cells: two tracks on the road to neuroinflammation. *Faseb J* 26 (8): 3103-3117.
- SKAPER S. D., FACCI, L. et GIUSTI, P. (2014) Mast cells, glia and neuroinflammation: partners in crime? *Immunology* 141 (3): 314-327.
- SNAIDERO N., MOBIUS, W., CZOPKA, T., HEKKING, L. H., MATHISEN, C., VERKLEIJ, D., GOEBBELS, S., EDGAR, J., MERKLER, D., LYONS, D. A., NAVE, K. A. et SIMONS, M. (2014) Myelin membrane wrapping of CNS axons by PI(3,4,5)P3-dependent polarized growth at the inner tongue. *Cell* 156 (1-2): 277-290.
- SOBOTTKA B., ZIEGLER, U., KAECH, A., BECHER, B. et GOEBELS, N. (2011) CNS live imaging reveals a new mechanism of myelination: the liquid croissant model. *Glia* 59 (12): 1841-1849.
- SONTHEIMER H. (1992) Astrocytes, as well as neurons, express a diversity of ion channels. *Can J Physiol Pharmacol* 70 Suppl S223-238.
- SOSVOROVA L., KANCEVA, R., VCELAK, J., KANCHEVA, L., MOHAPL, M., STARKA, L. et HAVRDOVA, E. (2015) The comparison of selected cerebrospinal fluid and serum cytokine levels in patients with multiple sclerosis and normal pressure hydrocephalus. *Neuro Endocrinol Lett* 36 (6): 564-571.
- SPASSKY N., DE CASTRO, F., LE BRAS, B., HEYDON, K., QUERAUD-LESAUX, F., BLOCH-GALLEGU, E., CHEDOTAL, A., ZALC, B. et THOMAS, J. L. (2002) Directional guidance of oligodendroglial migration by class 3 semaphorins and netrin-1. *J Neurosci* 22 (14): 5992-6004.
- SPONHEIM J., POLLHEIMER, J., OLSEN, T., BALOGH, J., HAMMARSTROM, C., LOOS, T., KASPRZYCKA, M., SORENSEN, D. R., NILSEN, H. R., KUCHLER, A. M., VATN, M. H. et HARALDSEN, G. (2010) Inflammatory bowel disease-associated interleukin-33 is

- preferentially expressed in ulceration-associated myofibroblasts. *Am J Pathol* 177 (6): 2804-2815.
- STENCE N., WAITE, M. et DAILEY, M. E. (2001) Dynamics of microglial activation: a confocal time-lapse analysis in hippocampal slices. *Glia* 33 (3): 256-266.
- STEVENS B., ALLEN, N. J., VAZQUEZ, L. E., HOWELL, G. R., CHRISTOPHERSON, K. S., NOURI, N., MICHEVA, K. D., MEHALOW, A. K., HUBERMAN, A. D., STAFFORD, B., SHER, A., LITKE, A. M., LAMBRIS, J. D., SMITH, S. J., JOHN, S. W. et BARRES, B. A. (2007) The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell* 131 (6): 1164-1178.
- STOGSDILL J. A., RAMIREZ, J., LIU, D., KIM, Y. H., BALDWIN, K. T., ENUSTUN, E., EJKEME, T., JI, R. R. et EROGLU, C. (2017) Astrocytic neuroligins control astrocyte morphogenesis and synaptogenesis. *Nature* 551 (7679): 192-197.
- STOKELY M. E., YORIO, T. et KING, M. A. (2005) Endothelin-1 modulates anterograde fast axonal transport in the central nervous system. *J Neurosci Res* 79 (5): 598-607.
- SUN L., WANG, H., WANG, Z., HE, S., CHEN, S., LIAO, D., WANG, L., YAN, J., LIU, W., LEI, X. et WANG, X. (2012) Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase. *Cell* 148 (1-2): 213-227.
- SUTER C. et COOTE, J. H. (1987) Intrathecally administered angiotensin II increases sympathetic activity in the rat. *J Auton Nerv Syst* 19 (1): 31-37.
- SUZUKI A., SUZUKI, R., FURUNO, T., TESHIMA, R. et NAKANISHI, M. (2004) N-cadherin plays a role in the synapse-like structures between mast cells and neurites. *Biol Pharm Bull* 27 (12): 1891-1894.
- SWEET M. J., LEUNG, B. P., KANG, D., SOGAARD, M., SCHULZ, K., TRAJKOVIC, V., CAMPBELL, C. C., XU, D. et LIEW, F. Y. (2001) A novel pathway regulating lipopolysaccharide-induced shock by ST2/T1 via inhibition of Toll-like receptor 4 expression. *J Immunol* 166 (11): 6633-6639.
- SYED Y. A., HAND, E., MOBIUS, W., ZHAO, C., HOFER, M., NAVE, K. A. et KOTTER, M. R. (2011) Inhibition of CNS remyelination by the presence of semaphorin 3A. *J Neurosci* 31 (10): 3719-3728.
- TAJIMA S., OSHIKAWA, K., TOMINAGA, S. et SUGIYAMA, Y. (2003) The increase in serum soluble ST2 protein upon acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 124 (4): 1206-1214.
- TAKAHASHI K., GHATEI, M. A., JONES, P. M., MURPHY, J. K., LAM, H. C., O'HALLORAN, D. J. et BLOOM, S. R. (1991) Endothelin in human brain and pituitary gland: comparison with rat. *J Cardiovasc Pharmacol* 17 Suppl 7 S101-103.

- TAKAHASHI K., ROCHFORD, C. D. et NEUMANN, H. (2005) Clearance of apoptotic neurons without inflammation by microglial triggering receptor expressed on myeloid cells-2. *J Exp Med* 201 (4): 647-657.
- TALABOT-AYER D., CALO, N., VIGNE, S., LAMACCHIA, C., GABAY, C. et PALMER, G. (2012) The mouse interleukin (Il)33 gene is expressed in a cell type- and stimulus-dependent manner from two alternative promoters. *J Leukoc Biol* 91 (1): 119-125.
- TANG S., HUANG, H., HU, F., ZHOU, W., GUO, J., JIANG, H., MU, R. et LI, Z. (2013) Increased IL-33 in synovial fluid and paired serum is associated with disease activity and autoantibodies in rheumatoid arthritis. *Clin Dev Immunol* 2013 985301.
- TANIGUCHI Y., AMAZAKI, M., FURUYAMA, T., YAMAGUCHI, W., TAKAHARA, M., SAINO, O., WADA, T., NIWA, H., TASHIRO, F., MIYAZAKI, J., KOGO, M., MATSUYAMA, T. et INAGAKI, S. (2009) Sema4D deficiency results in an increase in the number of oligodendrocytes in healthy and injured mouse brains. *J Neurosci Res* 87 (13): 2833-2841.
- TANZOLA M. B., ROBBIE-RYAN, M., GUTEKUNST, C. A. et BROWN, M. A. (2003) Mast cells exert effects outside the central nervous system to influence experimental allergic encephalomyelitis disease course. *J Immunol* 171 (8): 4385-4391.
- TCHOUGOUNOVA E., PEJLER, G. et ABRINK, M. (2003) The chymase, mouse mast cell protease 4, constitutes the major chymotrypsin-like activity in peritoneum and ear tissue. A role for mouse mast cell protease 4 in thrombin regulation and fibronectin turnover. *J Exp Med* 198 (3): 423-431.
- TCHOUGOUNOVA E., LUNDEQUIST, A., FAJARDO, I., WINBERG, J. O., ABRINK, M. et PEJLER, G. (2005) A key role for mast cell chymase in the activation of pro-matrix metalloprotease-9 and pro-matrix metalloprotease-2. *J Biol Chem* 280 (10): 9291-9296.
- THEOHARIDES T. C., KEMPURAJ, D., TAGEN, M., CONTI, P. et KALOGEROMITROS, D. (2007) Differential release of mast cell mediators and the pathogenesis of inflammation. *Immunol Rev* 217 65-78.
- THOMAS G. D. (2011) Neural control of the circulation. *Adv Physiol Educ* 35 (1): 28-32.
- TIERNEY J. B., KHARKRANG, M. et LA FLAMME, A. C. (2009) Type II-activated macrophages suppress the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunol Cell Biol* 87 (3): 235-240.
- TITELBAUM D. S., DEGENHARDT, A. et KINKEL, R. P. (2005) Anti-tumor necrosis factor alpha-associated multiple sclerosis. *AJNR Am J Neuroradiol* 26 (6): 1548-1550.



- TIWARI-WOODRUFF S. K., BUZNIKOV, A. G., VU, T. Q., MICEVYCH, P. E., CHEN, K., KORNBLUM, H. I. et BRONSTEIN, J. M. (2001) OSP/claudin-11 forms a complex with a novel member of the tetraspanin super family and beta1 integrin and regulates proliferation and migration of oligodendrocytes. *J Cell Biol* 153 (2): 295-305.
- TKACZYK C., HOREJSI, V., IWAKI, S., DRABER, P., SAMELSON, L. E., SATTERTHWAITE, A. B., NAHM, D. H., METCALFE, D. D. et GILFILLAN, A. M. (2004) NTAL phosphorylation is a pivotal link between the signaling cascades leading to human mast cell degranulation following Kit activation and Fc epsilon RI aggregation. *Blood* 104 (1): 207-214.
- TOMINAGA S., KUROIWA, K., TAGO, K., IWAHANA, H., YANAGISAWA, K. et KOMATSU, N. (1999) Presence and expression of a novel variant form of ST2 gene product in human leukemic cell line UT-7/GM. *Biochem Biophys Res Commun* 264 (1): 14-18.
- TOMS R., WEINER, H. L. et JOHNSON, D. (1990) Identification of IgE-positive cells and mast cells in frozen sections of multiple sclerosis brains. *J Neuroimmunol* 30 (2-3): 169-177.
- TONG G. et JAHR, C. E. (1994) Block of glutamate transporters potentiates postsynaptic excitation. *Neuron* 13 (5): 1195-1203.
- TOOSY A., CICCARELLI, O. et THOMPSON, A. (2014) Symptomatic treatment and management of multiple sclerosis. *Handb Clin Neurol* 122 513-562.
- TOWNSEND M. J., FALLON, P. G., MATTHEWS, D. J., JOLIN, H. E. et MCKENZIE, A. N. (2000) T1/ST2-deficient mice demonstrate the importance of T1/ST2 in developing primary T helper cell type 2 responses. *J Exp Med* 191 (6): 1069-1076.
- TRABOULSEE A., SIMON, J. H., STONE, L., FISHER, E., JONES, D. E., MALHOTRA, A., NEWSOME, S. D., OH, J., REICH, D. S., RICHERT, N., RAMMOHAN, K., KHAN, O., RADUE, E. W., FORD, C., HALPER, J. et LI, D. (2016) Revised Recommendations of the Consortium of MS Centers Task Force for a Standardized MRI Protocol and Clinical Guidelines for the Diagnosis and Follow-Up of Multiple Sclerosis. *AJNR Am J Neuroradiol* 37 (3): 394-401.
- TRAPP B. D., PETERSON, J., RANSOHOFF, R. M., RUDICK, R., MORK, S. et BO, L. (1998) Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med* 338 (5): 278-285.
- TRAVERS J., ROCHMAN, M., MIRACLE, C. E., HABEL, J. E., BRUSILOVSKY, M., CALDWELL, J. M., RYMER, J. K. et ROTHENBERG, M. E. (2018) Chromatin regulates IL-33 release and extracellular cytokine activity. *Nat Commun* 9 (1): 3244.
- TREMBLAY M. E., LOWERY, R. L. et MAJEWSKA, A. K. (2010) Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience. *PLoS Biol* 8 (11): e1000527.

- TREMBLAY M. E., STEVENS, B., SIERRA, A., WAKE, H., BESSIS, A. et NIMMERJAHN, A. (2011) The role of microglia in the healthy brain. *J Neurosci* 31 (45): 16064-16069.
- TRIPATHI R. B., CLARKE, L. E., BURZOMATO, V., KESSARIS, N., ANDERSON, P. N., ATTWELL, D. et RICHARDSON, W. D. (2011) Dorsally and ventrally derived oligodendrocytes have similar electrical properties but myelinate preferred tracts. *J Neurosci* 31 (18): 6809-6819.
- TSAI H. H., FROST, E., TO, V., ROBINSON, S., FFRENCH-CONSTANT, C., GEERTMAN, R., RANSOHOFF, R. M. et MILLER, R. H. (2002) The chemokine receptor CXCR2 controls positioning of oligodendrocyte precursors in developing spinal cord by arresting their migration. *Cell* 110 (3): 373-383.
- UESUGI N., MURAMATSU, R. et YAMASHITA, T. (2009) Endothelin promotes neurite elongation by a mechanism dependent on c-Jun N-terminal kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 383 (4): 509-512.
- ULLIAN E. M., SAPPERSTEIN, S. K., CHRISTOPHERSON, K. S. et BARRES, B. A. (2001) Control of synapse number by glia. *Science* 291 (5504): 657-661.
- VAN NASSAUW L., ADRIAENSEN, D. et TIMMERMANS, J. P. (2007) The bidirectional communication between neurons and mast cells within the gastrointestinal tract. *Auton Neurosci* 133 (1): 91-103.
- VAN OOSTEN B. W., BARKHOF, F., TRUYEN, L., BORINGA, J. B., BERTELSMANN, F. W., VON BLOMBERG, B. M., WOODY, J. N., HARTUNG, H. P. et POLMAN, C. H. (1996) Increased MRI activity and immune activation in two multiple sclerosis patients treated with the monoclonal anti-tumor necrosis factor antibody cA2. *Neurology* 47 (6): 1531-1534.
- VASILE F., DOSSI, E. et ROUACH, N. (2017) Human astrocytes: structure and functions in the healthy brain. *Brain Struct Funct* 222 (5): 2017-2029.
- VERDIEV B. I., POLTAVTSEVA, R. A., PODGORNYI, O. V., MAREI, M. V., ZINOVYEVA, R. D., SUKHIKH, G. T. et ALEKSANDROVA, M. A. (2009) Molecular genetic and immunophenotypical analysis of Pax6 transcription factor and neural differentiation markers in human fetal neocortex and retina in vivo and in vitro. *Bull Exp Biol Med* 148 (4): 697-704.
- VOCCA L., DI SANO, C., UASUF, C. G., SALA, A., RICCOBONO, L., GANGEMI, S., ALBANO, G. D., BONANNO, A., GAGLIARDO, R. et PROFITA, M. (2015) IL-33/ST2 axis controls Th2/IL-31 and Th17 immune response in allergic airway diseases. *Immunobiology* 220 (8): 954-963.
- VUKMAN K. V., FORSONITS, A., OSZVALD, A., TOTH, E. A. et BUZAS, E. I. (2017) Mast cell secretome: Soluble and vesicular components. *Semin Cell Dev Biol* 67 65-73.

- WAKE H., MOORHOUSE, A. J., JINNO, S., KOHSAKA, S. et NABEKURA, J. (2009) Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. *J Neurosci* 29 (13): 3974-3980.
- WAKE H., LEE, P. R. et FIELDS, R. D. (2011) Control of local protein synthesis and initial events in myelination by action potentials. *Science* 333 (6049): 1647-1651.
- WALCZAK H. (2011) TNF and ubiquitin at the crossroads of gene activation, cell death, inflammation, and cancer. *Immunol Rev* 244 (1): 9-28.
- WALLACH D., VARFOLOMEEV, E. E., MALININ, N. L., GOLTSEV, Y. V., KOVALENKO, A. V. et BOLDIN, M. P. (1999) Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu Rev Immunol* 17 331-367.
- WALLRAFF A., KOHLING, R., HEINEMANN, U., THEIS, M., WILLECKE, K. et STEINHAUSER, C. (2006) The impact of astrocytic gap junctional coupling on potassium buffering in the hippocampus. *J Neurosci* 26 (20): 5438-5447.
- WANG B., GUO, W. et HUANG, Y. (2012) Thrombospondins and synaptogenesis. *Neural Regen Res* 7 (22): 1737-1743.
- WANG H. H., HSIEH, H. L., WU, C. Y. et YANG, C. M. (2010) Endothelin-1 enhances cell migration via matrix metalloproteinase-9 up-regulation in brain astrocytes. *J Neurochem* 113 (5): 1133-1149.
- WANG H. H., HSIEH, H. L. et YANG, C. M. (2011) Nitric oxide production by endothelin-1 enhances astrocytic migration via the tyrosine nitration of matrix metalloproteinase-9. *J Cell Physiol* 226 (9): 2244-2256.
- WANG L., DU, F. et WANG, X. (2008) TNF-alpha induces two distinct caspase-8 activation pathways. *Cell* 133 (4): 693-703.
- WARNER T. D., BUDZIK, G. P., MATSUMOTO, T., MITCHELL, J. A., FORSTERMANN, U. et MURAD, F. (1992a) Regional differences in endothelin converting enzyme activity in rat brain: inhibition by phosphoramidon and EDTA. *Br J Pharmacol* 106 (4): 948-952.
- WARNER T. D., SCHMIDT, H. H., KUK, J., MITCHELL, J. A. et MURAD, F. (1992b) Human brain contains a metalloprotease that converts big endothelin-1 to endothelin-1 and is inhibited by phosphoramidon and EDTA. *Br J Pharmacol* 106 (3): 505-506.
- WATANABE M., NAKAMOTO, K., INUI, T., SADA, M., HONDA, K., TAMURA, M., OGAWA, Y., YOKOYAMA, T., SARAYA, T., KURAI, D., ISHII, H. et TAKIZAWA, H. (2018) Serum sST2 levels predict severe exacerbation of asthma. *Respir Res* 19 (1): 169.

- WEBER M. S., PROD'HOMME, T., YOUSSEF, S., DUNN, S. E., RUNDLE, C. D., LEE, L., PATARROYO, J. C., STUVE, O., SOBEL, R. A., STEINMAN, L. et ZAMVIL, S. S. (2007) Type II monocytes modulate T cell-mediated central nervous system autoimmune disease. *Nat Med* 13 (8): 935-943.
- WEBMD (2018) Alternative and Complementary Therapies for MS. <https://www.webmd.com/multiple-sclerosis/multiple-sclerosis-alternative-therapies#1>, 09-septembre-2018.
- WEHRWEIN E. A., ORER, H. S. et BARMAN, S. M. (2016) Overview of the Anatomy, Physiology, and Pharmacology of the Autonomic Nervous System. *Compr Physiol* 6 (3): 1239-1278.
- WEINBERG E. O., SHIMPO, M., HURWITZ, S., TOMINAGA, S., ROULEAU, J. L. et LEE, R. T. (2003) Identification of serum soluble ST2 receptor as a novel heart failure biomarker. *Circulation* 107 (5): 721-726.
- WEIR R. A., MILLER, A. M., MURPHY, G. E., CLEMENTS, S., STEEDMAN, T., CONNELL, J. M., MCINNES, I. B., DARGIE, H. J. et MCMURRAY, J. J. (2010) Serum soluble ST2: a potential novel mediator in left ventricular and infarct remodeling after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 55 (3): 243-250.
- WELLE M. (1997) Development, significance, and heterogeneity of mast cells with particular regard to the mast cell-specific proteases chymase and tryptase. *J Leukoc Biol* 61 (3): 233-245.
- WERNERSSON S. et PEJLER, G. (2014) Mast cell secretory granules: armed for battle. *Nat Rev Immunol* 14 (7): 478-494.
- WESTFALL T. C., MACARTHUR, H. et WESTFALL, D. P. (2017) Chapter 8: Neurotransmission: The Autonomic and Somatic Motor Nervous Systems. Dans McGraw-Hill Education LLC. (Éds). Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics. New York (13th edition), 115-148.
- WICHER G., HUSIC, E., NILSSON, G. et FORSBERG-NILSSON, K. (2013) Developmental expression of IL-33 in the mouse brain. *Neurosci Lett* 555 171-176.
- WIESINGER H., HAMPRECHT, B. et DRINGEN, R. (1997) Metabolic pathways for glucose in astrocytes. *Glia* 21 (1): 22-34.
- WILHELM M., SILVER, R. et SILVERMAN, A. J. (2005) Central nervous system neurons acquire mast cell products via transgranulation. *Eur J Neurosci* 22 (9): 2238-2248.
- WILKEN J. A. et SULLIVAN, C. (2007) Recognizing and treating common psychiatric disorders in multiple sclerosis. *Neurologist* 13 (6): 343-354.

- WILSON N. S., DIXIT, V. et ASHKENAZI, A. (2009) Death receptor signal transducers: nodes of coordination in immune signaling networks. *Nat Immunol* 10 (4): 348-355.
- WITTING A., MULLER, P., HERRMANN, A., KETTENMANN, H. et NOLTE, C. (2000) Phagocytic clearance of apoptotic neurons by Microglia/Brain macrophages in vitro: involvement of lectin-, integrin-, and phosphatidylserine-mediated recognition. *J Neurochem* 75 (3): 1060-1070.
- WOLTERS P. J., PHAM, C. T., MUILENBURG, D. J., LEY, T. J. et CAUGHEY, G. H. (2001) Dipeptidyl peptidase I is essential for activation of mast cell chymases, but not tryptases, in mice. *J Biol Chem* 276 (21): 18551-18556.
- WOO D. H., HAN, K. S., SHIM, J. W., YOON, B. E., KIM, E., BAE, J. Y., OH, S. J., HWANG, E. M., MARMORSTEIN, A. D., BAE, Y. C., PARK, J. Y. et LEE, C. J. (2012) TREK-1 and Best1 channels mediate fast and slow glutamate release in astrocytes upon GPCR activation. *Cell* 151 (1): 25-40.
- WOOD B., VAN DER MEI, I. A., PONSONBY, A. L., PITTAS, F., QUINN, S., DWYER, T., LUCAS, R. M. et TAYLOR, B. V. (2013) Prevalence and concurrence of anxiety, depression and fatigue over time in multiple sclerosis. *Mult Scler* 19 (2): 217-224.
- WU Q., KUO, H. C. et DENG, G. G. (2005) Serine proteases and cardiac function. *Biochim Biophys Acta* 1751 (1): 82-94.
- WYSS M. T., JOLIVET, R., BUCK, A., MAGISTRETTI, P. J. et WEBER, B. (2011) In vivo evidence for lactate as a neuronal energy source. *J Neurosci* 31 (20): 7477-7485.
- XIAO J., YANG, R., BISWAS, S., QIN, X., ZHANG, M. et DENG, W. (2015) Mesenchymal stem cells and induced pluripotent stem cells as therapies for multiple sclerosis. *Int J Mol Sci* 16 (5): 9283-9302.
- XIAO Y., LAI, L., CHEN, H., SHI, J., ZENG, F., LI, J., FENG, H., MAO, J., ZHANG, F., WU, N., XU, Y., TAN, Z., GONG, F. et ZHENG, F. (2018) Interleukin-33 deficiency exacerbated experimental autoimmune encephalomyelitis with an influence on immune cells and glia cells. *Mol Immunol* 101 550-563.
- XIN W. et BONCI, A. (2018) Functional Astrocyte Heterogeneity and Implications for Their Role in Shaping Neurotransmission. *Front Cell Neurosci* 12 141.
- XIONG Z., THANGAVEL, R., KEMPURAJ, D., YANG, E., ZAHEER, S. et ZAHEER, A. (2014) Alzheimer's disease: evidence for the expression of interleukin-33 and its receptor ST2 in the brain. *J Alzheimers Dis* 40 (2): 297-308.
- XU D., EMOTO, N., GIAID, A., SLAUGHTER, C., KAW, S., DEWIT, D. et YANAGISAWA, M. (1994) ECE-1: a membrane-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1. *Cell* 78 (3): 473-485.

- YAMAMOTO T., KIMURA, T., OTA, K., SHOJI, M., INOUE, M., SATO, K., OHTA, M. et YOSHINAGA, K. (1992) Central effects of endothelin-1 on vasopressin release, blood pressure, and renal solute excretion. *Am J Physiol* 262 (6 Pt 1): E856-862.
- YANAGISAWA K., TAKAGI, T., TSUKAMOTO, T., TETSUKA, T. et TOMINAGA, S. (1993) Presence of a novel primary response gene ST2L, encoding a product highly similar to the interleukin 1 receptor type 1. *FEBS Lett* 318 (1): 83-87.
- YANAGISAWA M., KURIHARA, H., KIMURA, S., TOMOBE, Y., KOBAYASHI, M., MITSUI, Y., YAZAKI, Y., GOTO, K. et MASAKI, T. (1988) A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332 (6163): 411-415.
- YANG Y., LIU, H., ZHANG, H., YE, Q., WANG, J., YANG, B., MAO, L., ZHU, W., LEAK, R. K., XIAO, B., LU, B., CHEN, J. et HU, X. (2017) ST2/IL-33-Dependent Microglial Response Limits Acute Ischemic Brain Injury. *J Neurosci* 37 (18): 4692-4704.
- YASUOKA S., KAWANOKUCHI, J., PARAJULI, B., JIN, S., DOI, Y., NODA, M., SONOBE, Y., TAKEUCHI, H., MIZUNO, T. et SUZUMURA, A. (2011) Production and functions of IL-33 in the central nervous system. *Brain Res* 1385 8-17.
- YIN H., LI, X. Y., LIU, T., YUAN, B. H., ZHANG, B. B., HU, S. L., GU, H. B., JIN, X. B. et ZHU, J. Y. (2012) Adenovirus-mediated delivery of soluble ST2 attenuates ovalbumin-induced allergic asthma in mice. *Clin Exp Immunol* 170 (1): 1-9.
- YOSHIKAWA T., SHINMI, O., GIAID, A., YANAGISAWA, M., GIBSON, S. J., KIMURA, S., UCHIYAMA, Y., POLAK, J. M., MASAKI, T. et KANAZAWA, I. (1990) Endothelin: a novel peptide in the posterior pituitary system. *Science* 247 (4941): 462-464.
- YOUNG K. M., PSACHOULIA, K., TRIPATHI, R. B., DUNN, S. J., COSSELL, L., ATTWELL, D., TOHYAMA, K. et RICHARDSON, W. D. (2013) Oligodendrocyte dynamics in the healthy adult CNS: evidence for myelin remodeling. *Neuron* 77 (5): 873-885.
- YU S. et DING, W. G. (1998) The 45 kDa form of glucose transporter 1 (GLUT1) is localized in oligodendrocyte and astrocyte but not in microglia in the rat brain. *Brain Res* 797 (1): 65-72.
- YU X., KASPRICK, A. et PETERSEN, F. (2015) Revisiting the role of mast cells in autoimmunity. *Autoimmun Rev* 14 (9): 751-759.
- YURT R. W., LEID, R. W., JR. et AUSTEN, K. F. (1977) Native heparin from rat peritoneal mast cells. *J Biol Chem* 252 (2): 518-521.
- ZAISS D. M. W., GAUSE, W. C., OSBORNE, L. C. et ARTIS, D. (2015) Emerging functions of amphiregulin in orchestrating immunity, inflammation, and tissue repair. *Immunity* 42 (2): 216-226.

- ZAMPRONIO A. R., KUZMISKI, J. B., FLORENCE, C. M., MULLIGAN, S. J. et PITTMAN, Q. J. (2010) Opposing actions of endothelin-1 on glutamatergic transmission onto vasopressin and oxytocin neurons in the supraoptic nucleus. *J Neurosci* 30 (50): 16855-16863.
- ZANDEE S. E. J., O'CONNOR, R. A., MAIR, I., LEECH, M. D., WILLIAMS, A. et ANDERTON, S. M. (2017) IL-10-producing, ST2-expressing Foxp3(+) T cells in multiple sclerosis brain lesions. *Immunol Cell Biol* 95 (5): 484-490.
- ZHANG H., VUTSKITS, L., CALAORA, V., DURBEC, P. et KISS, J. Z. (2004a) A role for the polysialic acid-neural cell adhesion molecule in PDGF-induced chemotaxis of oligodendrocyte precursor cells. *J Cell Sci* 117 (Pt 1): 93-103.
- ZHANG Q., PANGRSIC, T., KREFT, M., KRZAN, M., LI, N., SUL, J. Y., HALASSA, M., VAN BOCKSTAELE, E., ZOREC, R. et HAYDON, P. G. (2004b) Fusion-related release of glutamate from astrocytes. *J Biol Chem* 279 (13): 12724-12733.
- ZHAO J. et ZHAO, Y. (2015) Interleukin-33 and its Receptor in Pulmonary Inflammatory Diseases. *Crit Rev Immunol* 35 (6): 451-461.
- ZHOU Y., WANG, Y., TISCHFIELD, M., WILLIAMS, J., SMALLWOOD, P. M., RATTNER, A., TAKETO, M. M. et NATHANS, J. (2014) Canonical WNT signaling components in vascular development and barrier formation. *J Clin Invest* 124 (9): 3825-3846.
- ZONTA B., TAIT, S., MELROSE, S., ANDERSON, H., HARROCH, S., HIGGINSON, J., SHERMAN, D. L. et BROPHY, P. J. (2008) Glial and neuronal isoforms of Neurofascin have distinct roles in the assembly of nodes of Ranvier in the central nervous system. *J Cell Biol* 181 (7): 1169-1177.
- ZONTA M., ANGULO, M. C., GOBBO, S., ROSENGARTEN, B., HOSSMANN, K. A., POZZAN, T. et CARMIGNOTO, G. (2003) Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nat Neurosci* 6 (1): 43-50.
- ZUCHERO J. B., FU, M. M., SLOAN, S. A., IBRAHIM, A., OLSON, A., ZAREMBA, A., DUGAS, J. C., WIENBAR, S., CAPRARIELLO, A. V., KANTOR, C., LEONOUKAKIS, D., LARIOSAWILLINGHAM, K., KRONENBERG, G., GERTZ, K., SODERLING, S. H., MILLER, R. H. et BARRES, B. A. (2015) CNS myelin wrapping is driven by actin disassembly. *Dev Cell* 34 (2): 152-167.

## **18. LISTE DES PUBLICATIONS**

### 18.1 Publications

#### 18.1.1 Articles composants la thèse

**DESBIENS L.**, LAPOINTE, C., GHARAGOZLOO, M., MAHMOUD, S., PEJLER, G., GRIS, D. et D'ORLEANS-JUSTE, P. (2016) Significant Contribution of Mouse Mast Cell Protease 4 in Early Phases of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Mediators Inflamm* 2016, pp. 9797021

**DESBIENS L.**, GENDRON, L., GHARAGOZLOO, M., LAPOINTE, C., VINCENT, L., PEJLER, G., GRIS, D. et D'ORLEANS-JUSTE, P. Experimental autoimmune encephalomyelitis potentiates mouse mast cell protease 4-dependent pressor responses to centrally or systemically administered big-endothelin-1. Manuscrit soumis à *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* le 19 décembre 2018 (n° de soumission : JPET/2018/256016)

#### 18.1.2 Contribution à d'autres articles de recherche

BROCHU I., HOUDE, M., **DESBIENS, L.**, SIMARD, E., GOBEIL, F., SEMAAN, W., BKAILY, G. et D'ORLEANS-JUSTE, P. (2013) High salt-induced hypertension in B2 knockout mice is corrected by the ETA antagonist, A127722. *Br J Pharmacol* 170 (2), pp. 266-277.

HOUDE M., JAMAIN, M. D., LABONTE, J., **DESBIENS, L.**, PEJLER, G., GURISH, M., TAKAI, S. et D'ORLEANS-JUSTE, P. (2013) Pivotal role of mouse mast cell protease 4 in the conversion and pressor properties of Big-endothelin-1. *J Pharmacol Exp Ther* 346 (1), pp. 31-37

SEMAAN W., **DESBIENS, L.**, HOUDE, M., LABONTE, J., GAGNON, H., YAMAMOTO, D., TAKAI, S., LAIDLAW, T., BKAILY, G., SCHWERTANI, A., PEJLER, G., LEVESQUE, C., DESJARDINS, R., DAY, R. et D'ORLEANS-JUSTE, P. (2015) Chymase inhibitor-sensitive synthesis of endothelin-1 (1-31) by recombinant mouse mast cell protease 4 and human chymase. *Biochem Pharmacol* 94 (2), pp. 91-100

HOUDE M., **DESBIENS, L.**, SCHWERTANI, A., PEJLER, G., IGLARZ, M. et D'ORLEANS-JUSTE, P. (2016b) Endothelin receptor antagonist macitentan or deletion of mouse mast cell protease 4 delays lesion development in atherosclerotic mice. *Life Sci* 159, pp. 71-75

HOUDE M., SCHWERTANI, A., TOUIL, H., **DESBIENS, L.**, SARRHINI, O., LECOMTE, R., LEPAGE, M., GAGNON, H., TAKAI, S., PEJLER, G., JACQUES, D., GOBEIL, F., JR., DAY, R. et D'ORLEANS-JUSTE, P. (2018) Mouse Mast Cell Protease 4 Deletion Protects Heart Function and Survival After Permanent Myocardial Infarction. *Front Pharmacol* 9, pp. 868



### 18.1.3 Chapitre de volume

HOUDE M., DESBIENS, L. et D'ORLEANS-JUSTE, P. (2016) Endothelin-1: Biosynthesis, Signaling and Vasoreactivity. *Adv Pharmacol* 77, pp. 143-175

### 18.1.4 Revue sur invitation

D'ORLEANS-JUSTE P., AKIDE NDUNGE, O. B., DESBIENS, L., TANOWITZ, H. B. et DESRUISSEAU, M. S. (2019) Endothelins in inflammatory neurological diseases. *Pharmacol Ther* 194, pp. 145-160

## 18.2 Présentations orales

*Significant contribution of the mast cell-derived chymase, mMCP-4, in early phases of multiple sclerosis in mice.* Louisane Desbiens, Catherine Lapointe, Denis Gris et Pedro D'Orléans-Juste. *14<sup>th</sup> International Conference on Endothelin (ET-14)*, Savannah, États-Unis. 2-5 septembre 2015

*Cardiovascular pharmacology of vasoactive factors revisited in the nonanesthetized mouse.* Louisane Desbiens, Modou Lo, Hanène Touil, Martin Houde, Joseph Mauban, Withrow Gil Weir et Pedro D'Orléans-Juste. *4<sup>th</sup> Annual Meeting of the International Academy of Cardiovascular Sciences (AISC)*, Sherbrooke, Canada. 22-24 septembre 2016

*Unmasking the functionality of super-sensitive ET<sub>B</sub> receptors in non-anesthetized mice.* Louisane Desbiens, Hanène Touil, Julie Reghem et Pedro D'Orléans-Juste. *15<sup>th</sup> International Conference on Endothelin (ET-15)*, Prague, République Tchèque. 4-7 octobre 2017

## 18.3 Présentations par affiche

*Characterization of the role of mouse mast cell protease 4 (mMCP-4) in the conversion of big-ET-1 in vitro and on basal hemodynamic parameters in conscious mice.* Louisane Desbiens, Walid Semaan, Martin Houde, Robert Day et Pedro D'Orléans-Juste. *Young Investigator Forum*, Toronto, Canada. 27-29 mai 2013

*Mastocytes derived or recombinant mouse mast cell protease 4 (mMCP-4) converts big-ET-1 to ET-1 (1-31).* Louisane Desbiens, Robert Day, Martin Houde, Walid Semaan, Shinji Takai, Mizuo Miyazaki, Gunnar Pejler et Pedro D'Orléans-Juste. *13<sup>th</sup> International Conference on Endothelin (ET-13)*, Tokyo, Japon. 8-11 septembre 2013

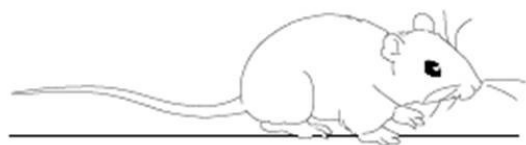
*Mastocytes derived or recombinant mouse mas cell protease 4 (mMCP-4) converts big-ET-1 to ET-1 (1-31).* Louisane Desbiens, Robert Day, Martin Houde, Walid Semaan, Shinji

Takai, Mizuo Miyazaki, Gunnar Pejler et Pedro D'Orléans-Juste. Journée PHARE 2013, Orford, Canada. 21-22 novembre 2013

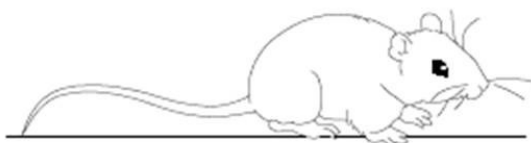
*Significant contribution of the mast cell-derived chymase, mMCP-4, in early phases of multiple sclerosis in mice.* Louisane Desbiens, Catherine Lapointe, Denis Gris et Pedro D'Orléans-Juste. 14<sup>th</sup> International Conference on Endothelin (ET-14), Savannah, États-Unis. 2-5 septembre 2015

*Cardiovascular pharmacology of vasoactive factors revisited in the nonanesthetized mouse.* Louisane Desbiens, Modou Lo, Hanène Touil, Martin Houde, Joseph Mauban, Withrow Gil Weir et Pedro D'Orléans-Juste. 4<sup>th</sup> Annual Meeting of the International Academy of Cardiovascular Sciences (AISC), Sherbrooke, Canada. 22-24 septembre 2016

### 19. ANNEXE 1



Score 0  
souris normale



Score 0.5  
début de perte de tonus caudal



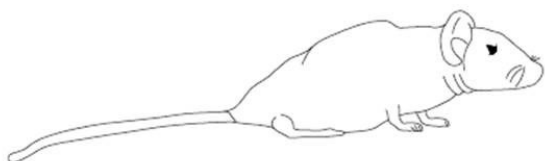
Score 1  
flaccidité de la queue



Score 1.5  
« funny walk »



Score 2  
faiblesse d'un ou des membres inférieurs



Score 3  
paralysie partielle des membres inférieurs  
(hanches et pattes)



Score 4  
paralysie complète des membres inférieurs

Score 5  
état moribond (décès ou euthanasie)

Figure 32 : Schématisation des scores cliniques utilisés pour l'évaluation de la progression de l'EAE chez les souris.

## 20. ANNEXE 2

Mise en contexte :

Dans une série d'expérimentations réalisées dans le cadre d'un autre projet dont l'article est en préparation, nous avons réalisé une étude comparative des courbes doses-réponses de l'ET-1 chez les souris conscientes et les souris anesthésiées à la kétamine/xylazine.

Méthodologie supplémentaire :

Dans un premier temps, les souris destinées au groupe d'animaux conscients ont été instrumentées en radio-télémétrie tel que décrit dans la sous-section 12.6.3.4 *Hemodynamic studies in conscious mice* de la méthodologie de l'article n°2. Brièvement les souris ont été anesthésiées afin d'implanter le cathéter de la puce de télémétrie au niveau de la crosse aortique et le corps de celle-ci dans une poche sous-cutanée (voir la Figure 33 pour une représentation schématique de l'implantation de l'appareil de radio-télémétrie chez la souris). Suite à la période de récupération post-chirurgicale, les souris ont été entraînées à être placées dans une cage de contention deux jours avant le début des enregistrements. Les deux jours suivants, les souris ont été entraînées à recevoir une injection intraveineuse au niveau de la veine de la queue à l'aide d'une injection de 100 µl de saline 0.9%. Finalement, les souris ont reçu une première dose d'ET-1 et une seconde dose après deux jours de repos. Les souris étaient immédiatement relâchées dans leur cage suite à l'injection intraveineuse. Quant à la partie de l'étude sur les souris anesthésiées, celles-ci étaient anesthésiées avec la kétamine/xylazine (dose charge : 87/13 mg/kg, dose de maintien au besoin : 29/4 mg/kg). L'artère carotide était canulée à l'aide d'un tube de polyéthylène 10 (PE10) afin de procéder aux enregistrements des paramètres hémodynamiques et la veine caudale était canulée avec une aiguille 30G½ montée en papillon avec un tube PE10 afin de procéder aux injections intraveineuses de notre agoniste. Suite à la procédure chirurgicale, un temps de 15 minutes était alloué aux souris afin de permettre une stabilisation des paramètres hémodynamiques avant de procéder à l'administration de notre peptide. Chaque souris anesthésiée n'a reçu qu'une seule dose d'ET-1 contenue dans un volume de 100 µl de saline 0.9%.

L'ET-1 (Tocris Biosciences, Ellisville, MO, États-Unis) a été diluée dans du tampon phosphate (PBS) pH = 7.4, sauf pour la dilution finale réalisée dans la saline 0.9%, afin d'administrer aux animaux conscients des doses entre 0.00001 et 100 fmol/kg et des doses de 0.01 à 1 nmol/kg aux souris anesthésiées.

Les enregistrements des paramètres hémodynamiques chez les souris instrumentées en radio-télémétrie ont été réalisés à l'aide du logiciel d'acquisition Dataquest ART 4.33 (DSI, St Paul, MN, États-Unis). Ces enregistrements ont été commencés 5 minutes avant la contention des animaux pour procéder à l'injection intraveineuse du peptide afin de déterminer les paramètres basaux de chaque animal et ont été poursuivis pour une période de 30 minutes suivant l'injection de l'agoniste.

Les enregistrements des paramètres hémodynamiques chez les souris anesthésiées ont été réalisés à l'aide du logiciel DMSI-400 (Digi-Med System Integrator, Louisville, KY, États-Unis). Les enregistrements ont été commencés dès la fin de la procédure chirurgicale et ont été poursuivis jusqu'à l'euthanasie de la souris, soit environ 30 minutes après l'injection intracaudale du peptide.

Les variations maximales de la pression artérielle moyenne (PAM) en réponse à l'administration intraveineuse exogène d'ET-1 ont été calculées en effectuant, pour chaque intervalle de 30 secondes, la différence entre la pression sanguine et les paramètres basaux mesurés avant l'administration de l'agoniste.

Les doses effectrices médianes ( $ED_{50}$ ) ont été calculées en ligne avec le logiciel Biodatafit 1.02 (<http://www.changbioscience.com/stat/ec50.html>; Chang Bioscience Inc., Castro Valley, CA, États-Unis), à partir des courbes doses-réponses.

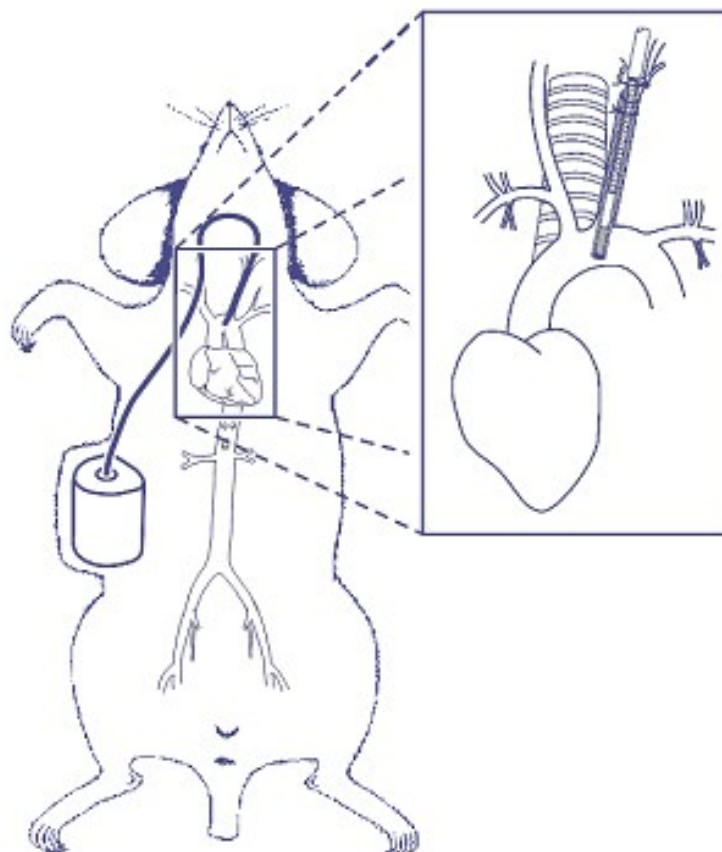


Figure 33 : Représentation de l'implantation chirurgicale d'une puce TA11PA-C10 dans la crosse aortique d'une souris.  
(Source : Data Sciences International)

### Résultats supplémentaires :

Le profil de réponse à l'administration exogène d'ET-1 chez la souris consciente est similaire à celui que l'on observe chez la souris anesthésiée. Ainsi l'administration intraveineuse d'une dose moyenne d'ET-1 chez la souris consciente (1 fmol/kg) ou chez la souris anesthésiée (0.5 nmol/kg) induit une augmentation équipotente de la pression artérielle moyenne stable dans le temps (résultats non présentés). Les augmentations de pression artérielle moyenne se produisent de façon dose-dépendante tant chez les souris conscientes que celles anesthésiées (Figure 34A). Toutefois, on observe un déplacement important, soit 6 unités logarithmiques, vers la gauche de la courbe dose-réponse réalisée chez les souris conscientes par rapport à la courbe obtenue avec les souris anesthésiées. Ainsi les  $ED_{50}$  calculées sont respectivement de  $1.19 \pm 0.694$  fmol/kg et de  $1.20 \pm 0.059$  nmol/kg. L'administration exogène d'ET-1 ne provoque pas d'effets particuliers sur le rythme cardiaque dans notre modèle (Figure 34B).

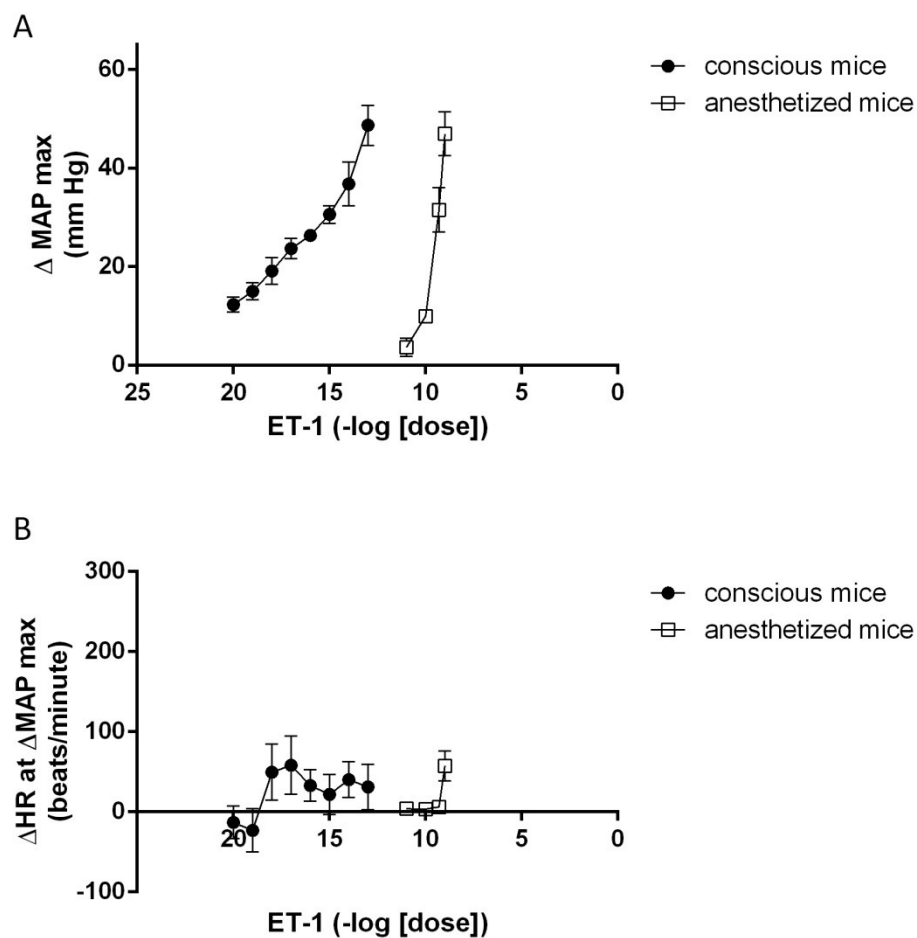


Figure 34 : Effets cardiovasculaires de l'administration de doses croissantes exogènes d'ET-1 chez les souris conscientes (cercles fermés) et chez les souris anesthésiées (carrés ouverts).

A) Courbe dose-réponse de la PAM suite à l'administration intraveineuse d'ET-1, B) Courbe dose-dépendante de la FC en réponse à l'injection i.v. d'ET-1. Chaque point correspond à la moyenne  $\pm$  SEM d'un minimum de 5 expériences indépendantes.



## 21. ANNEXE 3

### Méthodologie supplémentaire :

Dans une première série d'expérimentations, nous avons traité des souris de type sauvage (WT) avec un inhibiteur des chymases, le TY-51469 (voir la Figure 35 pour une représentation de la molécule), ou son véhicule, soit du NaOH 0.025 M dans du PBS pH = 7.4, par voie intrapéritonéale à une dose de 10 mg/kg deux fois par jour (*bid*) en commençant deux jours avant l'immunisation en EAE, tel que décrit dans la section méthodologie des articles présentés dans cette thèse. Le traitement a ensuite été poursuivi tous les jours pendant 3 semaines post-EAE. Dans une seconde série d'expérimentations, nous avons procédé à l'administration centrale, par voie intrathécale, de notre inhibiteur des chymases. Un premier groupe de souris (n = 2) a reçu une dose charge de de TY-51469 de 7.5 mg/souris au jour -6, c'est-à-dire 6 jours avant l'immunisation des souris en EAE et une dose de 1 mg/souris de l'inhibiteur au jour -3. Un deuxième groupe de souris (n = 4) a reçu une première dose de 1 mg/souris au jour -3. Un troisième groupe de souris (n = 4) a reçu le véhicule du TY-51469 au jour -3. Puis le jour de l'immunisation en EAE et tous les trois jours par la suite les souris ont reçu soit 1 mg/souris de TY-51469, soit le véhicule, pour une durée totale de 3 semaines post-EAE.

Toutes les souris traitées ont été suivies pour évaluer l'évolution des scores cliniques pour toute la durée du traitement. Après 3 semaines, les souris ont été anesthésiées par injection intrapéritonéale d'avertine et euthanasiées par ponction sanguine intracardiaque avant que les organes centraux soient prélevés. Les moelles épinières lombaires ont été plongées dans la formaline puis paraffinées et coupées en sections de 5 µm et mises sur lames. Les tissus ont ensuite été déparaffinés et colorés au *luxol fast blue* pour une quantification myélinique post-traitement, tel que décrit dans les sections 11.6.3.3 *Histopathology*, 11.6.3.4 *Histology stains* et 11.6.3.4.1 *Luxol fast blue (myelin)* de l'article 1 dans cette thèse.

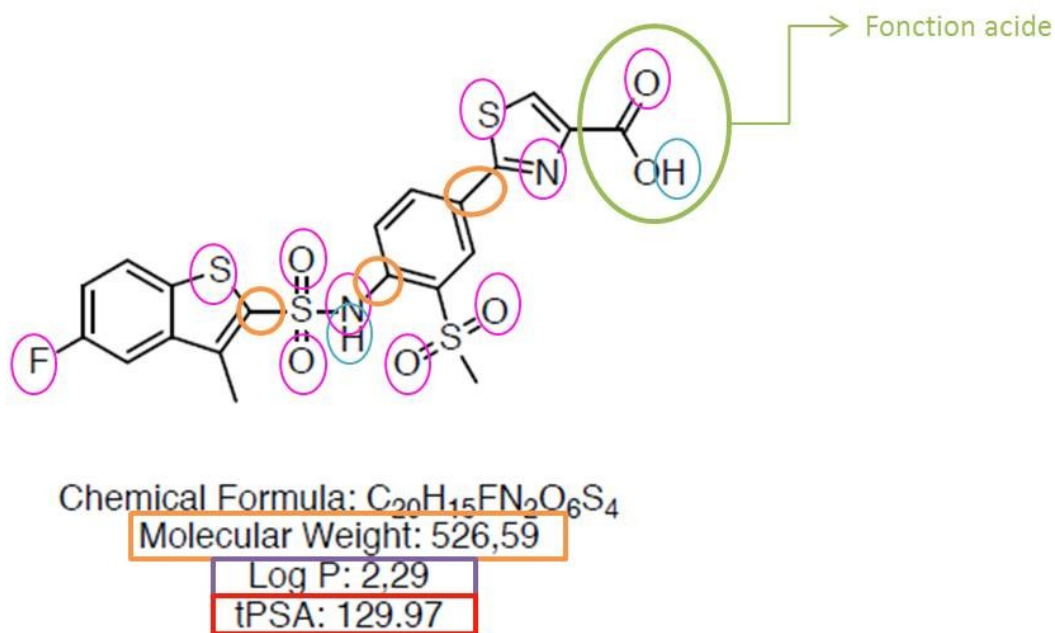


Figure 35 : Représentation moléculaire du TY-51469 et identification de ses fonctions physico-chimiques.

Les cercles bleus montrent les donneurs de ponts hydrogènes. Les cercles roses montrent les accepteurs de ponts hydrogènes. Le carré orange met en évidence le poids moléculaire. Le carré mauve met en évidence le coefficient de partage octanol/eau. Ces quatre particularités représentent les règles de Lipinski dans la détermination des propriétés pharmacologiques d'une molécule. Les cercles orange montrent les liens rotatifs du TY-51469 et le rectangle rouge met en évidence la surface polaire de la molécule qui sont, tous deux, des déterminants de la biodisponibilité selon les règles de Veber.

### Résultats supplémentaires :

La Figure 36 présente les résultats concernant le traitement intrapéritonéal des souris de type sauvage avec le TY-51469. Comme on peut le constater en A) et en B), l'inhibiteur, administré par voie systémique, n'a pas eu d'incidence sur le développement de l'EAE, ni sur la survenue des événements pathologiques puisque les moyennes des scores cliniques du groupe ayant reçu l'inhibiteur sont les mêmes que ceux du groupe traité avec le véhicule. De plus, la coloration histologique des moelles épinières lombaires, à l'aide du *luxol fast blue*, nous a permis de voir que le TY-51469 administré en périphérie n'avait pas d'effet protecteur sur la dégradation de la myéline après 3 semaines d'EAE. En effet, les pourcentages de coloration spécifique, montrés en D), sont les mêmes pour les groupes véhicule et TY-51469. De plus, ces niveaux de myéline à 3 semaines post-EAE correspondent à ceux montrés dans l'article 1, publié en 2016, pour le même temps post-immunisation chez les souris de type sauvage, soit un peu moins de 20%. Nous en avons donc conclu que notre inhibiteur ne possédait pas les propriétés physico-chimiques lui permettant de traverser la barrière hémato-encéphalique et que dans notre modèle la chymase se retrouvant au niveau central avait des effets délétères dans le développement de l'EAE chez la souris.

La Figure 37 montre les résultats obtenus suite aux traitements au TY-51469 ou son véhicule par voie intrathécale chez les souris de type sauvage. Tout comme avec le traitement systémique, l'administration centrale de l'inhibiteur, selon le protocole et le dosage utilisés dans cette partie expérimentale, n'a pas d'incidence sur l'évolution et la survenue des événements pathologiques. En effet, tel que l'on observe dans les graphiques en A) et en B), la moyenne des scores cliniques, de même que la sommation après 1, 2 et 3 semaines post-immunisation, sont les mêmes dans nos deux groupes expérimentaux. Toutefois, l'administration spinale du TY-51469 a permis d'obtenir une protection myélinique suivant l'immunisation en EAE. En effet, l'histologie des moelles épinières lombaires nous a permis d'observer un pourcentage de coloration spécifique à la myéline plus important dans les groupes traités au TY-51469 par rapport aux moelles épinières des souris ayant reçu seulement le véhicule. Encore une fois, chez les souris traitées au véhicule, les pourcentages de myéline s'apparentent à ce que l'on avait montré en 2016 chez les souris de type sauvage, soit un peu moins de 20%. Alors que le traitement central avec le TY-41569 nous permet d'obtenir des pourcentages de myéline similaires à ce que l'on observait chez les souris mMCP-4 KO à 3 semaines post-EAE, soit entre 20 et 25%. Ces résultats nous permettent de poser l'hypothèse que l'inhibition de la chymase au niveau central pourrait permettre de ralentir la dégradation de la myéline en situation pathologique.

Toutefois, ce type de traitement devrait être optimisé. D'abord car la dose charge initiale administrée par voie centrale a provoqué une réaction comportementale ressemblant à de la douleur (« *rolling* » et grattage) et s'est avérée létale chez certaines de nos souris. De plus, il serait préférable d'optimiser la molécule afin d'améliorer ses propriétés physico-chimiques afin de la rendre perméable à la barrière hémato-encéphalique et même de la rendre biodisponible pour un traitement *per os* qui facilite beaucoup l'administration et l'utilisation potentielle au niveau clinique si les résultats s'avéraient concluants.

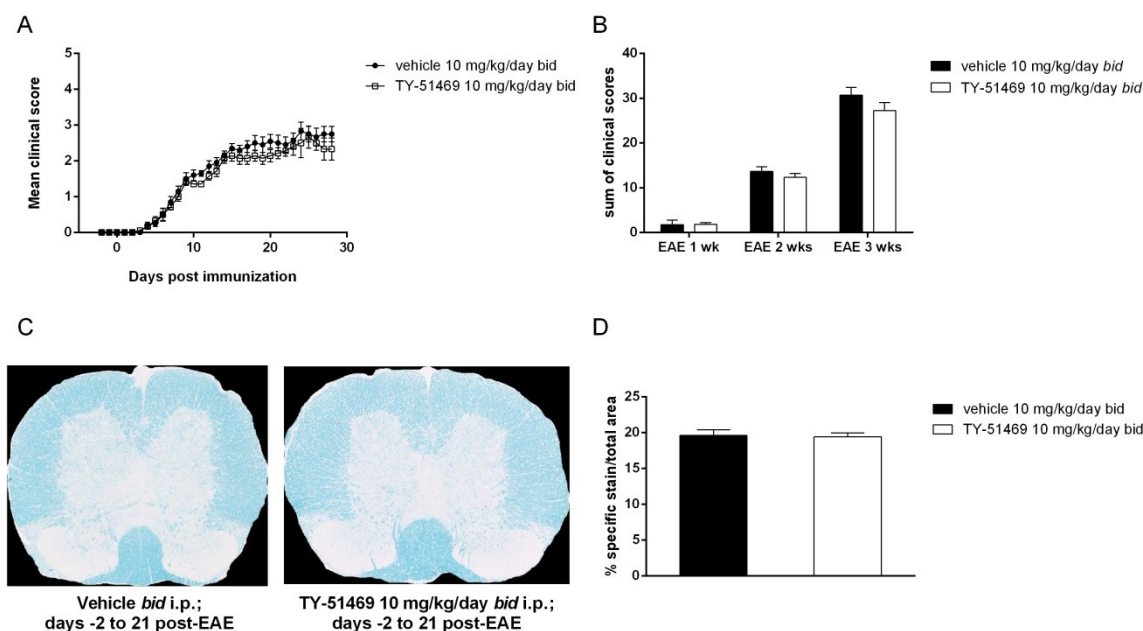


Figure 36 : Effet d'un traitement avec un inhibiteur des chymases, le TY-51469, administré par voie intrapéritonéale à raison d'une dose de 10 mg/kg deux fois par jour chez la souris de type sauvage

A) sur les scores cliniques moyens observés quotidiennement, B) sur la somme des scores cliniques après 1, 2 et 3 semaines de traitement, C) sur l'histologie de la myéline des moelles épinières lombaires après 3 semaines de traitement et D) quantification des histologies de la coloration au *luxol fast blue*. Chaque point et bande en A) et B) représente la moyenne  $\pm$  SEM pour  $n = 7$  ou 10 souris. Chaque bande en D) représente la moyenne  $\pm$  SEM pour  $n = 4$  analysé en triplicata.

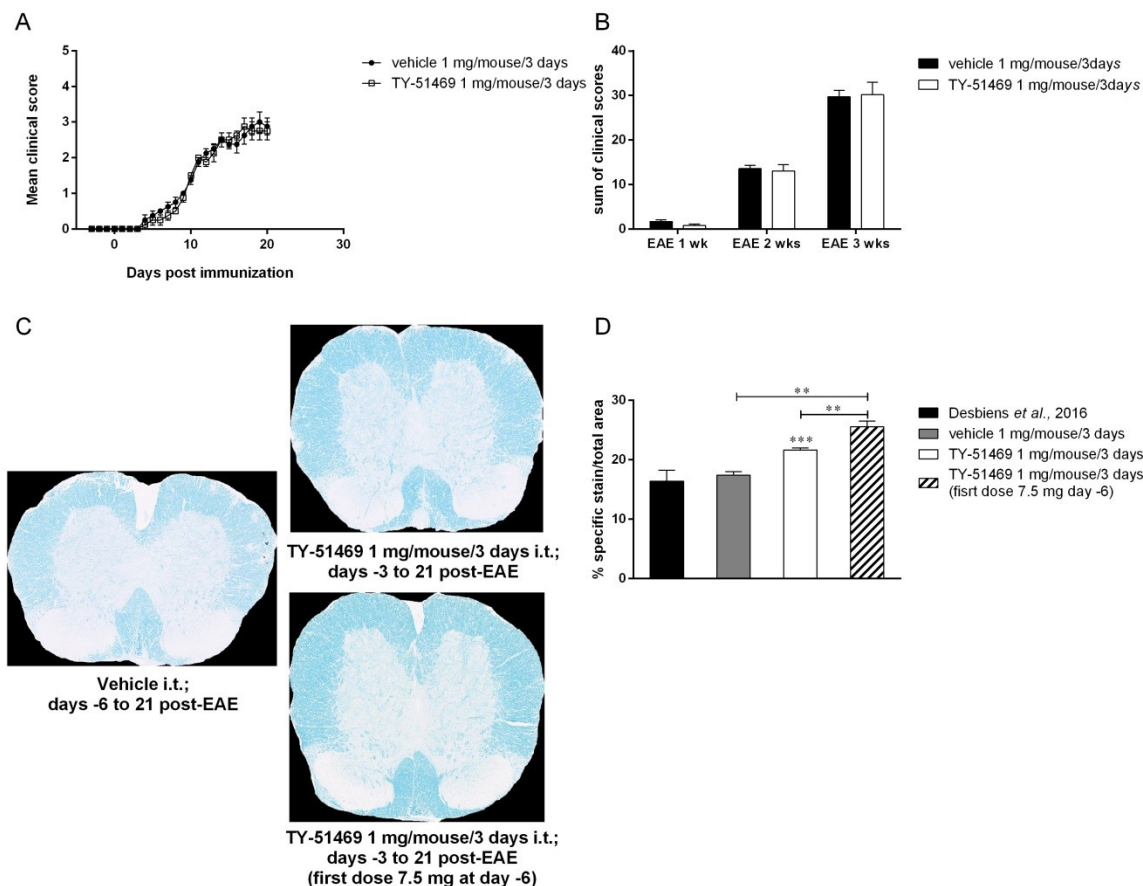


Figure 37 : Effet d'un traitement avec un inhibiteur des chymases, le TY-51469, administré par voie intrathécale à raison d'une dose de 1 mg/souris à tous les trois jours chez la souris de type sauvage

A) sur les scores cliniques moyens observés quotidiennement, B) sur la somme des scores cliniques après 1, 2 et 3 semaines de traitement, C) sur l'histologie de la myéline des moelles épinières lombaires après 3 semaines de traitement et D) quantification des histologies de la coloration au *luxol fast blue*. Chaque point et bande en A) et B) représente la moyenne  $\pm$  SEM pour  $n = 4$  ou 6 souris. Chaque bande en D) représente la moyenne  $\pm$  SEM pour  $n = 2$  ou 4 analysé en triplicata. \*\*  $p < 0.01$  et \*\*\*  $p < 0.001$ .